

AUGUSTO CESAR DE ANDRADE MEYER

**A INFLUÊNCIA DA DIABETES MELLITUS NO REPARO DE
ENXERTOS ÓSSEOS AUTÓGENOS ASSOCIADOS OU NÃO
À MEMBRANA COLÁGENA REABSORVÍVEL: estudo
histomorfométrico em ratos**



2012

AUGUSTO CESAR DE ANDRADE MEYER

**A INFLUÊNCIA DA DIABETES MELLITUS NO REPARO DE
ENXERTOS ÓSSEOS AUTÓGENOS ASSOCIADOS OU NÃO À
MEMBRANA COLÁGENA REABSORVÍVEL: estudo
histomorfométrico em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia

Orientadora: Prof^a Adj. Maria Aparecida Neves Jardim

São José dos Campos

2012

BANCA EXAMINADORA

Profª Adjunta Maria Aparecida Neves Jardim (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP - Univ Estadual Paulista

Prof. Assit. Dr. Mauro Pedrini Santamaria

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP - Univ Estadual Paulista

Dr. Fernando Augusto Perrella

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP - Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 02 de julho de 2012

Dedicatória

À Deus, por ter me dado a vida, saúde e energia para
cumprir os desafios diários

Aos meus pais Isabel Fatima e Augusto Meyer, por toda
amor, atenção e apoio, que acreditaram em mim, estendendo
as mãos nas horas mais difíceis.

À minha namorada Tábata (Japinha), fiel parceira, por todo
amor, ajuda e companheirismo tornando os desafios mais
suaves.

Às minhas irmãs Chrisley e Flávia e sobrinhos, Guilherme,
Júlia e Rafa.

À Sra Yukiko Eto, grande amiga, com imensa gratidão

Agradecimentos

À Ucha, minha orientadora. Que desde iniciação científica na graduação me aceitou como orientado. Agradeço pela sua amizade, pelo aprendizado, a confiança, a liberdade que me deu em todo o desenvolvimento do trabalho.

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Carlos Augusto Pavanelli.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga-Ito

Aos Professores da Disciplina de Cirurgia Traumatologia Bucomaxilofacial, pelo conhecimento, amizade e confiança, que desde 2005 me deram a oportunidade de participar de atividades na disciplina.

Ao Prof. Dr. Warley David Kerbauy, pela amizade, atenção e vontade de ensinar a ser um profissional sempre melhor.

À Marcinha e Sandra, do Departamento de Cirurgia e Diagnóstico Bucal, toda a ajuda e amizade.

Aos Colegas da pós graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho.

À Ana Lourdes, pelo capricho na confecção dos meus blocos e lâminas.

Ao Professor Dr. Ney Soares de Araújo, e as técnicas de laboratório de patologia Jeruza e Nadir e a faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE QUADROS E TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Diabetes Mellitus	20
2.1.1 Diabetes e Osteopenia	21
2.1.2 Estudos em animais	23
2.1.3 Estudos em humanos	26
2.2 Regeneração Óssea Guiada	26
3 PROPOSIÇÃO	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Animais e grupos experimentais	32
4.2 Anestesia	33
4.3 Indução da diabetes mellitus experimental	33
4.4 Procedimentos cirúrgicos	35
4.4.1 Tricotomia e anti-sepsia	35
4.4.2 Anestesia Local	35
4.4.3 Execução do enxerto	36
4.4.4 Antibiótico	38
4.4.5. Eutanásia	43
4.5 Processamento histológico	43
4.5.1 Desmineralização das peças cirúrgicas	43
4.5.2 Preparo das lâminas para análise histológica e histomorfométrica.....	44

4.6 Análise Microscópica	45
4.6.1 Análise histológica	46
4.6.2 Análise Histomorfométrica	46
4.6.2.1 Análise Histomorfométrica da altura do enxerto	47
4.6.2.2 Análise histomorfométrica da neoformação óssea nas bordas do enxerto	49
4.6.2.2 Análise histomorfométrica da área de integração do enxerto ao leito receptor.....	51
4.7 Delineamento experimental e análise estatística	53
5 RESULTADOS.....	55
5.1 Análise descritiva	56
5.1.1 Dia 0	56
5.1.2 Dia 7	57
5.1.3 Dia 14	57
5.1.4 Dia 21	58
5.1.5 Dia 45	59
5.1.6 Dia 60	60
5.2 Análise Histomorfométrica	69
5.2.1 Altura do enxerto.....	69
5.2.2 Neoformação	72
5.2.3 Integração leito receptor e enxerto.	75
6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÃO	92
5 REFERÊNCIAS*	93
ANEXO 1	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Indução da diabetes experimental: a) perfuração da veia caudal; b) aferição da glicemia pré indução; c) administração via intraperitoneal da diluição de aloxana monihidratada.....	34
Figura 2 - Esquema representativo do resultado cirúrgico.....	36
Figura 3 - Exposição e preparo do leito doador: a) tricotomia e desinfecção; b) incisão linear; c) divulsão muscular e exposição do osso parietal; d) área doadora do enxerto	39
Figura 4 - Preparo do enxerto: a) broca tipo lança 1,0 mm de diâmetro; b) fresa helicoidal de 1,2mm; c) perfuração inicial do enxerto; d) alargamento da perfuração.....	40
Figura 5. - Fixação do parafuso ao enxerto: a,b) parafuso cortical de fixação auto rosqueante de titânio; c, colocação do parafuso no enxerto; d) conjunto parafuso e enxerto; e) colocação do parafuso na membrana colágena; f) conjunto parafuso, membrana colágena e enxerto.....	41
Figura 6 - Exposição e preparo do leito receptor: a) tricotomia e desinfecção; b) incisão linear; c) divulsão muscular e exposição do osso parietal; d) área doadora do enxerto; e, f) recobrimento da loja óssea cirúrgica com membrana colágena reabsorvível; g) sutura periósteo e camada muscular.....	42

Figura 7 - Aparelho de micro-ondas PELCO 3441, Ted Pella, Inc., CA,USA.....	44
Figura 8 - Esquema representativo dos cortes histológicos.....	45
Figura 9 – Representação da calibração do programa computacional NIH Image J 1.35s para a análise da altura do enxerto.....	48
Figura 10 – Representação da medida e resultado da altura do enxerto	49
Figura 11 – Representação da calibração do programa computacional NIH Image J 1.35s para a análise da neoformação óssea ao redor do enxerto	50
Figura 12 – Representação da marcação dos pontos de intersecção no grid com neoformação óssea ao redor do enxerto e resultado.....	51
Figura 13 – Representação da calibração do programa computacional NIH Image J 1.35s para a análise da área de osseointegração leito-enxerto.....	52
Figura 14 – Representação da medida e resultado da área de osseointegração leito-enxerto.....	53
Figura 15 – Rato diabético com retinopatia e dificuldade de cicatrização.....	56

Figura 16 – Dia 0. a) Rato C-E; b) Rato C-ME. (E) Enxerto, (L) Leito receptor, (M) Membrana.....	61
Figura 17 – Dia 7. a e b) Rato C-E; c e d) Rato D-E. (E) Enxerto, (L) Leito receptor, (★) neoformação óssea, (❖) Tecido conjuntivo.....	61
Figura 18 – Dia 14. a, b e c) Rato C-E; d e e) Rato D-ME. (E) Enxerto, (L) Leito receptor, (★) neoformação óssea, (❖) Tecido conjuntivo.....	62
Figura 19 – Dia 21. a, b, c e d) Rato C-E; e, f, g e h) Rato C-ME. (E) Enxerto, (L) Leito receptor,(M) Membrana (★) neoformação óssea, (❖) Tecido conjuntivo.....	63
Figura 20 – Dia 21. a, b, c e d) Rato D-E; e, f, e g) Rato D-ME. (E) Enxerto, (L) Leito receptor,(M) Membrana (★) neoformação óssea, (❖) Tecido conjuntivo.....	64
Figura 21 – Dia 45. a, b, c e d) Rato C-E; e, f, g e h) Rato C-ME. (E) Enxerto, (L) Leito receptor, (★) neoformação óssea.....	65
Figura 22 – Dia 45. a, b, c e d) Rato D-E; e, f, g e h) Rato D-ME. (E) Enxerto, (L) Leito receptor, (★) neoformação óssea.....	66
Figura 23 – Dia 60. a, b, c e d) Rato C-E; e, f, g e h) Rato C-ME. (E) Enxerto, (L) Leito receptor, (★) neoformação óssea, (◆)Reabsorção lateral do enxerto e neoformação óssea.).....	67

Figura 24 – Dia 60. a, b, c e d) Rato D-E; e, f, g e h) Rato DME. (E) Enxerto, (L) Leito receptor, (★) neoformação óssea, (◆) Reabsorção lateral do enxerto e neoformação óssea..... 68

Figura 25 – Gráfico dos valores médios das condições experimentais Condição x Tratamento x Tempo comparados entre si. D-E (Diabético-enxerto); D-ME (Diabético- membrana-enxerto); C-E (Controle-Enxerto); C-ME (Controle-membrana-enxerto)..... 71

Figura 26 – Gráfico dos valores médios das condições experimentais Condição x Tratamento x Tempo comparados entre si. D-E (Diabético-enxerto); D-ME (Diabético- membrana-enxerto); C-E (Controle-Enxerto); C-ME (Controle-membrana-enxerto)..... 74

Figura 27 – Gráfico dos valores médios das condições experimentais Condição x Tratamento x Tempo comparados entre si D-E (Diabético-enxerto); D-ME (Diabético- membrana-enxerto); C-E (Controle-Enxerto); C-ME (Controle-membrana-enxerto)..... 77

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão da altura do enxerto (μm).....	70
Tabela 2 - Teste ANOVA. Tempo x Condição para altura do enxerto..	70
Tabela 3 - Teste ANOVA. Tempo x Tratamento para a altura do enxerto	71
Tabela 4 - Média e desvio padrão da neoformação.....	73
Tabela 5 - Teste ANOVA. Tempo x Condição para neoformação óssea	73
Tabela 6 - Teste ANOVA. Tempo x Tratamento para neoformação óssea.....	74
Tabela 7 - Média e desvio padrão da integração Leito receptor e enxerto	76
Tabela 8 - Teste ANOVA. Tempo x Condição integração Leito receptor e enxerto	77
Tabela 9 - Teste ANOVA. Tempo x Tratamento para integração Leito receptor enxerto	77

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE	= Advanced glycated end products. (produtos finais da glicação avançada)
C	= Controle
DM	= Diabetes Mellitus
D	= Diabético
E	= Enxerto
EOA	= Enxerto ósseo autógeno
HE	= Hematoxilina e Eosina
IL	= Interleucina
L	= Leito receptor
ME	= Enxerto recoberto por membrana
PGE	= Prostaglandina-e
PTFE-e	= Politetrafluoretileno expandido
RANK-L	= Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand. (Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa- β)
ROG	= Regeneração óssea guiada
TNF	= Tumoral necrosis factor. (Fator de necrose tumoral)
TRAP	= Tartrate-resistant acid phosphatase (Fosfatase ácida resistente ao tartarato)

Meyer ACA. A influência da Diabetes Mellitus no reparo de enxertos ósseos autógenos associados ou não à membrana colágena reabsorvível: estudo histomorfométrico em ratos [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2012.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o processo de reparo ósseo do enxerto ósseo autógeno em bloco, em ratos diabéticos e verificar a influência da membrana colágena reabsorvível sobre este processo. Para tanto, foram utilizados 60 ratos adultos (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar) com sessenta dias de idade, com peso em torno de 200 gramas, que foram divididos em dois grupos experimentais, cada grupo contendo 30 animais: Grupo Teste (D), composto por ratos com Diabetes Mellitus induzida pela administração de aloxana e; Grupo Controle (C) composto por ratos normoglicêmicos. Foram considerados diabéticos os animais que apresentarem glicemia superior a 200 mg/dl. Todos os animais foram submetidos a enxertos na hemi-mandíbula direita e esquerda. Os enxertos na hemi-mandíbula do lado esquerdo foram recobertos por membrana de colágeno reabsorvível, propiciando o recobrimento de todo o bloco enxertado (C-ME e D-ME). Os enxertos realizados na hemi-mandíbula do lado direito foram realizados da mesma maneira, porém sem o recobrimento pela membrana de colágeno (C-E e D-E). A eutanásia dos animais foi realizada por perfusão cardíaca com formalina 4% nos períodos: 0 hora, 7, 14, 21, 45 e 60 dias. As peças foram desmineralizadas com solução de EDTA 10%, pH 7,4, e incluídas em bloco de parafina e obtenção de cortes seriados com 5 μ m de espessura. A coloração utilizada foi Hematoxilina e Eosina para análise histológica e histomorfométrica, ambas realizadas em microscopia de luz. As estruturas analisadas foram: matriz óssea do leito receptor e enxerto, matriz óssea neoformada na interface leito receptor e enxerto e ao redor do enxerto, osteócitos, osteoblastos, tecido conjuntivo interposto entre leito receptor e enxerto. A análise histomorfométrica foi realizada com utilização do programa computacional NIH Image J 1.35. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio do programa computacional: MINITAB (Minitab, version 14.12, 2004) com análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, ambos ao nível de significância

convencional de 5%. Os resultados mostraram que os ratos diabéticos, em todos os períodos, exibiram maior quantidade de espaços trabeculares, tanto no leito receptor quanto no enxerto. No período 7, alguns ratos apresentaram discreta neoformação óssea, sendo a maioria nos grupos C-E e D-E. partir do dia 14, observou-se neoformação óssea nas bordas do enxerto e na interface leito-enxerto discretos pontos de união. A partir do dia 21, observou-se reabsorção das bordas laterais do enxerto nos grupos C-E e D-E. Observou-se também maior neoformação óssea na interface leito-enxerto e ao redor do enxerto. Os grupos C-ME e D-ME apresentaram maiores superfícies de integração que os grupos C-E e D-E. No dia 45, todos os enxertos dos grupos D-ME e C-ME estavam integrados ao leito receptor. A delimitação da neoformação óssea nas bordas do enxerto nos grupos D-ME e C-ME foi de difícil visualização. No último período, todos os espécimes mostraram neoformação óssea lateral, e apenas os grupos C-E e C-ME mostraram neoformação óssea sobre o enxerto. A altura do enxerto foi menor nos ratos diabéticos, entretanto, nem a condição nem o tratamento influenciaram estatisticamente na altura dos blocos. Quanto à neoformação óssea na lateral do enxerto, pode se dizer que a diabetes não influenciou de maneira negativa, enquanto a presença da membrana teve seu maior efeito sobre a neoformação óssea aos 45 dias. Houve aumento da integração do enxerto ao leito com o decorrer do tempo, sendo nas duas condições, diferença estatisticamente significativa a partir do dia 21. Já a membrana teve influência estatisticamente significativa sobre a integração do enxerto ao leito receptor apenas aos 45 dias. Os resultados permitem concluir que a presença da DM induzida não interferiu de maneira negativa no reparo dos enxerto ósseos autógenos em bloco. A presença da membrana colágena favoreceu a integração do enxerto ao leito receptor, bem como neoformação óssea ao redor do enxerto.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus. Enxerto ósseo autógeno. Regeneração óssea guiada. Formação óssea.

Meyer ACA. *The influence os diabetes mellitus in the repais of autogenous bone grafts with or without resorbable collagen membrane: a histomorphometric study in rats [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2012.*

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the bone healing process of autogenous bone graft in diabetic rats and the influence of resorbable collagen membrane. For this purpose, it was 60 adult rats (*Rattus norvegicus*, Albinus variation, Wistar) sixty days old, weighing around 200 grams, which were divided into two experimental groups, each group containing 30 animals: Test Group (D), rats with diabetes mellitus induced by administration of alloxan and Control Group (C) normoglycemic rats. It was considered diabetic animals showing glucose levels above 200 mg/dL. All animals underwent hemi-grafts surgery in the right and left jaws. The hemi-grafts in the left lower jaw were covered by resorbable collagen membrane, allowing the coating of the entire block graft (C-ME and D-ME). The hemi-grafts in the right jaw were performed the same way, but without covering the collagen membrane (C-E and D-E). The animals were euthanased by cardiac perfusion with 4% formalin after: 0 hour, 7, 14, 21, 45 and 60 days. The pieces were demineralized in 10% EDTA solution, pH 7,4, and each peace was included in paraffin and obtained serial sections with 5 µm thick. The hematoxylin and eosin stain for histological and histomorphometric analysis. The parameters were analyzed: bone matrix graft and recipient bed, newly formed bone matrix at the interface graft and recipient bed and around the graft, osteocytes, osteoblasts, connective tissue interposed between the recipient bed and the graft. Histomorphometric analysis was performed using the computer program NIH Image J 1.35. The data were statistically analyzed using the computer program MINITAB (Minitab, version 14.12, 2004) with analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test, both using the significance of 5%. The results showed that the diabetic rats exhibited at all periods, a greater amount of trabecular spaces in both graft and the recipient bed. In period 7, come rats had mild bone formation, mostly in groups C-E and D-E. From day 14, there was new bone formation at the edges of the graft and graft-recipient

bed interface at discrete points of union. From day 21, there is absorption of the side edges of the graft groups in C-E and D-E. There was also more bone formation at the interface graft-recipient bed and around the graft. Groups C-ME and D-ME had the largest areas of osseointegration that C-E and D-E groups. On day 45, all grafts from groups D-ME and C-ME were integrated into the recipient bed. The demarcation of new bone formation at the edges of the graft in groups C-ME and D-ME was difficult to visualize. In the last period, all specimens showed new bone formation, and only the groups C-E and C-ME showed new bone formation over the graft. The height of the graft was lower in diabetic rats, however, neither condition is not influenced statistically. As for new bone formation on the side of the graft it can be said that diabetes has not influenced negatively, while the presence of the membrane had its greatest effect on bone formation at 45 days. Increased integration of the graft to the bed with the passage of time, and in both conditions, statistically significant difference from day 21. The presence of the collagen membrane has statistically significant influence on the integration of the graft to the recipient only for 45 days. The results allow to conclude that the presence of induced DM did not interfere negatively in the repair of autogenous bone graft. The presence of collagen membrane promoted the integration of the graft to the recipient bed, and new bone formation around the graft.

Keywords: Diabetes Mellitus. Autogenous bone graft. Guided bone regeneration.

1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida é acompanhado pelo aumento de doenças associadas a idades mais avançadas, como hipertensão, osteoporose e diabetes. Associado ao envelhecimento da população observa-se maior demanda por procedimentos estéticos e funcionais reconstrutivos, como os implantes osseointegrados.

Um dos requisitos para o sucesso dos implantes osseointegrados é que a área receptora tenha quantidade suficiente de tecido ósseo, situação que não ocorre em muitos casos. Nesses casos, pode-se lançar mão de técnicas que visam o ganho de tecido ósseo. Dentre essas técnicas, a considerada “*gold standard*” é a do enxerto ósseo autógeno (Jardini et al., 2005), devido às suas propriedades osteogênicas e por não apresentar riscos de rejeição (Khan et al., 2005). A técnica da Regeneração Óssea Guiada tem sido associada aos enxertos ósseos autógenos, com melhores resultados, como tem sido demonstrado por diversos estudos (Alberius et al., 1992; Donos et al., 2002).

Doenças sistêmicas como diabetes e osteoporose sugerem uma potencial contra-indicação para os implantes.

A Diabetes *Mellitus* (DM) é uma doença crônica evolutiva que se caracteriza pelas alterações dos metabolismos de carboidratos, gorduras e lipídeos. Vários estudos têm mostrado que a DM tipo 1 está associada com diminuição da massa óssea, alguns autores, inclusive, têm considerado a DM como um fator predisponente ao desenvolvimento de

osteoporose (Hui et al., 1985; Selby , 1988; Loder, 1988; Isaia et al., 1999).

Tem-se sugerido que o desenvolvimento precoce de DM tipo 1 pode comprometer a mineralização óssea a longo prazo, e que a prevalência de osteopenia pode ser superior a 50% nesses pacientes (Rosenbloom et al., 1984; Wiske et al., 1982).

A patogênese da doença óssea associada a DM ainda não é completamente conhecida e explicada, e acredita-se que se deva a fatores como hiperglicemia, deficiência insulínica, microangiopatia, doença microvascular do osso, redução do suprimento sanguíneo a da angiogênese, entre outros.

Na tentativa de simular a DM em modelo animal, a utilização da aloxana tem mostrado que existe uma influência negativa sobre o reparo ósseo, especialmente na cicatrização de feridas cirúrgicas e fraturas. Entretanto, ainda há poucos dados na literatura que elucidem o mecanismo pelo qual essas alterações ocorrem.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diabetes Mellitus

A Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica evolutiva que se caracteriza pelas alterações dos metabolismos de carboidratos, gorduras e lipídeos devido à falta de insulina ou na sua capacidade de agir na transferência de glicose plasmática para as células (American Diabetes Association, 2007).

A hiperglicemia na diabetes desenvolve-se em decorrência da diminuição da secreção de insulina e/ou diminuição da sensibilidade das células à insulina (Lamster et al., 2008), e causa diversas complicações, como nefropatia, retinopatia e neuropatia (Kayath et al., 1994; Lopez-Ibarra et al., 2001; Fujii et al., 2008; Räkel et al., 2008), e atraso da cicatrização (Esteves et al., 2008; Lamster et al., 2008). A dificuldade de cicatrização deve-se às complicações diretas da doença, tais como atraso na proliferação celular (Maruyama et al., 2007), a diminuição no metabolismo do colágeno (Falanga, 2005) e de outros componentes do tecido de granulação, como as glicoproteínas e mucopolissacarídeos (Desmouliere et al., 1995; Galkowska et al., 2006).

Anormalidades no processo de remodelação óssea são uma das principais consequências em pacientes diabéticos (Fujii et al., 2008; Giglio, Lama, 2001).

2.1.1 Diabetes e Osteopenia

Vários estudos têm mostrado que a DM tipo 1 está associada com diminuição da massa óssea ou osteopenia (Hui et al., 1985; Loder, 1988; Selby, 1988). Alguns autores, inclusive, têm considerado a DM como um fator predisponente ao desenvolvimento de osteoporose (Isaia et al., 1999).

Tem-se sugerido que o desenvolvimento precoce de DM tipo 1 pode comprometer a mineralização óssea a longo prazo (Valerio et al., 2002). Esses pacientes, na idade adulta, apresentam maior risco de desenvolverem osteopenia e fraturas, quando comparados aos pacientes com diabetes tipo 2 (Isaia et al., 1999; Gunczler et al., 2001; Vestergaard, 2007). Estudos têm mostrado prevalência de osteopenia superior a 50% em pacientes com DM tipo 1 (Wiske et al., 1982; Rosenbloom et al., 1984).

A patogênese da doença óssea associada a DM ainda não é completamente conhecida e explicada, e acredita-se que se deva a fatores como hiperglicemia (Duarte et al., 2005; Hamada et al., 2007; Vestergaard, 2009), deficiência insulínica (Thraikill et al., 2005; Abbassy et al., 2008), e controle glicêmico inadequado, microangiopatia (Burkhardt et al., 1981; Craig et al., 1984), distúrbios no metabolismo do cálcio e vitamina D (Duarte et al., 2005), desnutrição crônica (Duarte et al., 2005), doença microvascular do osso (Duarte et al., 2005), e diminuição da taxa de remodelação óssea (Guarnieri et al., 1993; Duarte et al., 2005) e da mineralização (Follak et al., 2003); redução do suprimento sanguíneo e da angiogênese, resposta inflamatória mais severa (Tuominen et al., 1999), diminuição na síntese de colágeno (Galluzzi et al., 2005); estresse oxidativo (Brownlee, 2001; Hamada et al., 2007), perda de peso (Hamada et al., 2007; Brownlee, 2001).

A osteopenia decorrente da DM leva ao aumento do número de fraturas (Loder, 1988; Schwartz, 2003; Hamada et al., 2007; Hamada et al., 2009; Vestergaard et al., 2009), com consequente atraso na sua cicatrização (Follak et al., 2004; Follak et al., 2005; Hamada et al., 2007; Hamada et al., 2009), e afeta a qualidade de vida (Hamada et al., 2007; Hamada et al., 2009).

Abbassy et al. (2010) observaram redução do volume trabecular com aumento dos espaços medulares em ratos diabéticos, indicando profundo impacto na integridade do osso.

Um dos fatores relacionados à diminuição da densidade mineral óssea na DM é a deficiência de insulina, uma vez que este quadro leva à diminuição do número e da função dos osteoblastos e osteoclastos, resultando em diminuição da remodelação óssea (Fujii et al., 2008).

Estudos *in vitro* mostraram que a insulina promove a proliferação e diferenciação de osteoblastos (Levy et al., 1986; Pun et al., 1989) aumenta a síntese de colágeno tipo 1 e formação óssea (Weiss et al., 1980), além de papel importante na formação dos osteoclastos (Ogata et al., 2000).

Estudos clínicos mostraram diminuição dos níveis séricos de osteocalcina, marcador de formação óssea e da função dos osteoblastos, em pacientes diabéticos (Inaba et al., 1999). Glajchen et al. (1988) observaram diminuição da massa óssea associada com significativa diminuição dos níveis séricos de osteocalcina em ratos com DM induzida pelo estreptozotocina.

Outros autores verificaram que a hiperglicemia induz a redução do metabolismo ósseo pois diminui a função dos osteoblastos e concentração sérica do osteocalcina (Verhaeghe et al., 1989; Gerdhem et al., 2005).

Segundo Javed e Romanos (2009) a hiperglicemia crônica causada pela DM no osso, diminui a proliferação dos osteoblastos, diminui a formação de matriz óssea e diminui a liberação de osteocalcina pelo osteoblasto; Sobre o osteoclasto, aumenta o recrutamento e sua diferenciação. A hiperglicemia aumenta ainda a produção de prostaglandinas (PGE2) e citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8 TNF- α), favorece a formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs), que no osso também aumenta a liberação das mesmas citocinas, os AGEs inibem a formação do colágeno e a liberação de osteocalcina pelo osteoblasto. Dessa forma a hiperglicemia desbalanceia o processo remodelação do osso provocando perda óssea.

2.1.2 Estudos em animais

Estudos com ratos com DM tipo 1 induzida por estreptozotocina mostraram diminuição da remodelação óssea e presença de osteopenia (Shyng et al., 2001; Thrailkill et al., 2005).

Devlin et al. (1996) realizaram extração de molares em ratos com DM induzida por estreptozotocina. Dez dias após a extração, os ratos controle e os diabéticos que foram tratados com insulina mostraram 2/3 do alvéolo preenchido por osso imaturo, e aos 42 dias, completo preenchimento do alvéolo, enquanto nos ratos diabéticos não tratados essa formação óssea foi significativamente diminuída nos mesmos períodos avaliados.

Follak et al. (2004) avaliaram, por meio da histomorfometria, o processo de formação e reabsorção óssea em defeitos ósseos de vários tamanhos no fêmur de ratos diabéticos

Knockout. Defeitos pequenos (0,4 mm) não mostraram diferenças no reparo entre os grupos. Defeitos de 0,8 mm só mostraram diferenças estatisticamente significantes 24 dias após o procedimento e exclusivamente em ratos diabéticos descompensados. Nos defeitos maiores que 1,2 mm, os ratos diabéticos não-compensados mostraram, aos 14 dias, diminuição significativa da aposição óssea, formação, mineralização, e tempo de mineralização, quando comparados com ratos diabéticos compensados e ratos normoglicêmicos. Os autores concluíram que a terapia com insulina melhora o controle metabólico da DM e consequentemente o reparo ósseo.

Em 2005, Follak et al. observaram novamente que a terapia com insulina melhora o controle metabólico da DM e consequentemente o reparo ósseo de fratura em fêmur de ratos diabéticos knockout, pois quatro semanas após a fratura, alterações severas na mineralização ocorreram apenas em ratos diabéticos descompensados

Esteves et al. (2008) avaliaram o processo de reparo ósseo em defeitos cirúrgicos criados em tíbias de ratos com DM. Os defeitos criados na tíbia direita foram preenchidos com osso autógeno particulado, enquanto os da tíbia esquerda foram preenchidos apenas por coágulo sanguíneo. Os resultados mostraram-se melhores nos defeitos preenchidos por osso autógeno. Os ratos normoglicêmicos mostraram maior neoformação óssea aos 30 dias, quando comparados aos ratos diabéticos. Concluindo que nos dois grupos, ocorreu melhor neoformação óssea nos defeitos preenchidos pelo osso autógeno, porém, qualitativamente melhor nos ratos não-diabéticos

Hamada et al. (2007) observaram, através de análise radiográfica, diminuição significativa do volume ósseo trabecular em ratos diabéticos. A análise histomorfométrica confirmou que tantos os parâmetros de formação como os de reabsorção óssea estavam

significativamente diminuídos nos ratos diabéticos. A densidade mineral óssea no fêmur diminuiu 15-20% nos ratos diabéticos quando comparado com os ratos controle.

Fujii et al. (2008) avaliaram o metabolismo ósseo em ratos da espécie Torii, conhecidos por apresentarem DM tipo 2 e não serem obesos. Os autores observaram significativa diminuição da resistência óssea antes da aparente nefropatia diabética, diminuição das funções tanto dos osteoblastos quanto dos osteoclastos, e que a administração de insulina melhorou a osteopenia e diminuiu o estresse oxidativo nos ratos com DM tipo 2.

Ohnishi et al. (2009) avaliaram a reabsorção óssea decorrente da doença periodontal em ratos com DM tipo 2 e observaram perda de osso alveolar em todos os animais. Observaram ainda que altos níveis de insulina afetam o recrutamento e diferenciação de osteoclastos pois impedem a via de sinalização do Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa- β (RANKL), impedindo assim a ativação dos osteoclastos.

Abbassy et al. (2010) analisaram a estrutura óssea de ratos com DM induzida por estreptozotocin através de histomorfometria, tomografia computadorizada. A análise histomorfométrica mostrou que as taxas de aposição e formação óssea estavam significativamente diminuídas quando comparado com ratos controle. A tomografia computadorizada mostrou deterioração na estrutura óssea em ratos diabéticos. Os resultados mostraram que a DM não controlada diminuiu a formação óssea mandibular, reduziu a taxa de remodelação óssea e afetou a qualidade da estrutura óssea, resultando em retardo no desenvolvimento esquelético.

2.1.3 Estudos em humanos

Estudos mostraram redução da densidade mineral óssea nos pacientes com DM tipo 1 (Vestergaard et al., 2007) e aumento da densidade mineral óssea em pacientes com DM tipo 2 (Isaia et al., 1999; Vestergaard et al., 2007).

Rix et al. (1999) observaram que pacientes com neuropatia periférica associada ao DM tipo 1 apresentavam maior redução da densidade mineral óssea.

Takizawa et al. (2008) avaliaram 151 homens portadores de DM tipo 2 e observaram redução significativa de osteocalcina sérica e níveis do marcador de reabsorção óssea Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) significativamente mais elevados nesses pacientes.

Capoglu et al. (2008) acompanharam durante 12 meses pacientes portadores de DM não controlada. Os pacientes foram submetidos a exames de urina e sangue para avaliação de marcadores séricos de formação e reabsorção óssea no início e no final da pesquisa. Os resultados mostraram que esses pacientes apresentavam níveis diminuídos de marcadores de formação e reabsorção óssea. Os autores concluíram que a melhora no controle glicêmico é crucial para a melhora no processo de remodelação óssea.

2.2 Regeneração Óssea Guiada

Os resultados clínicos favoráveis obtidos com o uso dos implantes osseointegrados e os resultados documentados sobre a

integração tecidual tornaram seu uso confiável no tratamento dos pacientes. Entretanto, um dos principais requisitos para o sítio que receberá o implante é o adequado volume de osso alveolar (Donos et al., 2002; Jardini et al., 2005; Adeyemo et al., 2008).

Técnicas para promover ganho de tecido ósseo, como a regeneração óssea guiada (ROG) e o enxerto ósseo autógeno (EOA) permitem a colocação de implantes em áreas que não seriam possíveis (Buser et al., 1995; Buser et al., 1996; Donos et al., 2002).

A ROG consiste na colocação de uma membrana e tem como objetivo promover ganho ósseo (Buser et al., 1993).

Esta técnica tem sido empregada em vários casos de implantes dentários em que há quantidade (volume) insuficiente de osso no local receptor do implante (Taguchi et al., 2005).

Para o sucesso da ROG, alguns requisitos devem ser seguidos, como estabilização mecânica do enxerto, prevenção de infecção bacteriana, manutenção do espaço sob a membrana, separação de células osteogênicas das não-osteogênicas (Alberius et al., 1992; Donos et al., 2002), estabilidade da membrana, tamanho dos poros nas membranas, selamento periférico entre a membrana e o osso, e adequado suprimento sanguíneo (Lundgren et al., 1995).

Para que a membrana seja efetiva, deve apresentar algumas características, como biocompatibilidade, integração ao tecido, seleção de células que irão repovoar a área, estabilidade mecânica e fácil manuseio (Kim et al., 2005).

A membrana colágena é um biomaterial reabsorvível. A membrana Bio-Gide (Bio-Gide®, Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland) é composta de fibras colágenas do tipo I e III de origem suína, sem qualquer outro componente orgânico ou químico. Apresenta duas camadas, uma compacta e outra porosa. A camada compacta apresenta superfície lisa que protege contra a infiltração por tecido conjuntivo,

enquanto a camada porosa permite a passagem de células. Quando utilizada para ROG, as duas camadas podem permitir a migração de células osteogênicas e impedir a proliferação de tecido conjuntivo, respectivamente (Taguchi et al., 2005).

Apesar de não apresentarem proteínas específicas do osso, as fibras colágenas da membrana colágena podem servir como um arcabouço para células osteogênicas em defeitos ósseos, além de funcionar como uma barreira contra a invasão do tecido conjuntivo circundante (Taguchi et al., 2005).

A técnica do EOA requer remoção de tecido ósseo do próprio paciente e tem sido considerada como “*gold standard*” das técnicas de ganho de tecido ósseo por ser imunologicamente inerte e osteogênico (Jardini et al., 2005; Khan et al., 2005).

A regeneração e a incorporação do enxerto ósseo envolvem a interação entre o enxerto ósseo e o leito receptor por meio de um complexo processo de proliferação celular, migração, diferenciação e revascularização (Adeyemo et al., 2008).

Quando a técnica do enxerto ósseo autógeno é utilizada isoladamente, apresenta como principal desvantagem a possibilidade de parte do osso enxertado sofrer reabsorção com o passar do tempo (Jardini et al., 2005), e alguns fatores como origem embriológica, arquitetura, dimensão e orientação do enxerto podem contribuir para o fracasso da técnica (Khan et al., 2005).

Matsuzaka et al. (2001) e Donos et al. (2002) demonstraram que o uso de membranas para recobrimento do enxerto autógeno acelera a migração de células osteogênicas, a formação de osso novo e a mineralização.

Hämmerle et al. (2001) observaram ganho de tecido ósseo em defeitos ósseos recobertos por membrana colágena reabsorvível concomitante à colocação do implante. Hämmerle et al.

(2008) observaram que a membrana colágena favoreceu o ganho de tecido ósseo horizontal prévio à cirurgia para colocação de implantes.

Donos et al. (2002) avaliaram a regeneração de enxertos ósseos autógenos em bloco com e sem recobrimento de membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e). Entre os dias 15 e 180 após a cirurgia, o enxerto passou por processo de reabsorção e remodelação, e a área criada pela membrana foi parcialmente ocupada pelo enxerto ósseo e gradualmente preenchida por osso neoformado. Após 180 dias, o enxerto recoberto por membrana estava completamente integrado no osso neoformado, o que tornou praticamente impossível a identificação da junção entre o enxerto e o osso neoformado. Nesse mesmo período, quando não houve recobrimento dos enxertos pela membrana, observou-se reabsorção das bordas do enxerto.

Jardini et al. (2005) avaliaram o uso de membranas de PTFE-e em espécimes de enxerto ósseo autógeno e observaram perda óssea no período de cicatrização do grupo em que a membrana não foi utilizada. A partir do 21º dia, o grupo que recebeu apenas o enxerto ósseo autógeno sofreu extensiva reabsorção óssea, enquanto o grupo em que os enxertos foram recobertos por membrana de PTFE-e mostrou regeneração óssea difusa além das bordas do enxerto.

Adeyemo et al. (2008) demonstraram em ovelhas que a combinação do enxerto ósseo em bloco e a ROG resulta em maior ganho ósseo em comparação com o enxerto ósseo usado isoladamente. Após 4 semanas, observou-se maior formação óssea nos espécimes em que o enxerto ósseo foi recoberto por membrana colágena reabsorvível. A membrana formou um espaço que foi preenchido pelas células formadoras de osso originadas da margem do enxerto ósseo durante o processo de regeneração.

As complicações decorrentes da DM são a principal causa de morbidade e mortalidade dos portadores dessa doença; E a melhora

do controle da DM vem se refletindo no aumento da expectativa de vida desses pacientes (Brownlee, 2001). Levando-se em consideração o aumento da incidência dessa patologia na população em geral, associada ao aumento da expectativa de vida e conseqüente aumento da demanda pelas reabilitações funcionais e estéticas com procedimentos reconstrutivos e implantes osseointegrados, seria interessante avaliar o comportamento biológico no processo de reparo dos enxertos autógenos em bloco em modelo animal.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar, quantitativamente e qualitativamente, o processo de reparo ósseo de enxerto ósseo autógeno em bloco, associado ou não à membrana colágena reabsorvível.

Verificar se a Diabetes Mellitus exerceu alguma influência quantitativa e qualitativa sobre o processo de reparo dos enxertos ósseos autógenos em bloco.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e grupos experimentais

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Local da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP sob o protocolo n° 02/2011-PA/CEP (ANEXO A).

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo n° 10/52697-7).

Nesse estudo foram utilizados 60 ratos adultos (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar) com sessenta dias de idade, com peso em torno de 200 g, mantidos em gaiolas, alimentados com ração Guabi Nutrilabor e água *ad libitum*, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP. Foi necessário a reposição de 12 ratos que morreram durante o estudo, 4 ratos após a indução ao diabetes, 3 ratos durante o procedimento cirúrgico e 3 ratos de causas desconhecidas, 2 ratos devido a sobredosagem anestésica.

Os 60 animais utilizados foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais, cada um contendo 30 animais:

- Grupo Teste (D), composto por ratos com diabetes induzida pela administração de aloxana.

- Grupo Controle (C) composto por ratos normoglicêmicos, ou seja, que não receberam a administração da aloxana.

O mesmo animal foi submetido a 2 cirurgias, uma em cada mandíbula, diminuindo-se assim pela metade o número de animais necessários ao estudo.

4.2 Anestesia

Para a realização das aferições da glicemia, cirurgias de enxertia e eutanásia, os animais foram anestesiados, via intramuscular, com uma solução de 13 mg/Kg de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5-6-dihidro-4H-1,3 tiazina (Anasedan – Agribands do Brasil), substância com propriedades sedativas e analgésicas, além de relaxante muscular e 33 mg/Kg de ketamina base (Dopalen – Agribands do Brasil), anestésico geral,.

4.3 Indução da diabetes mellitus experimental

Para indução da DM experimental, utilizou-se aloxana monohidratada (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluída em solução salina estéril, na concentração de 150mg/mL.

Os ratos selecionados ficaram em jejum por um período de 16 horas. Os ratos foram anestesiados e foi realizado a coleta de

amostra de sangue da veia caudal para a aferição da glicemia inicial com o aparelho One Touch Ultra (Johnson&Johnson), seguido da administração via intraperitoneal da solução de aloxana na dose de 1 ml/kg de peso do animal (Figura 1).

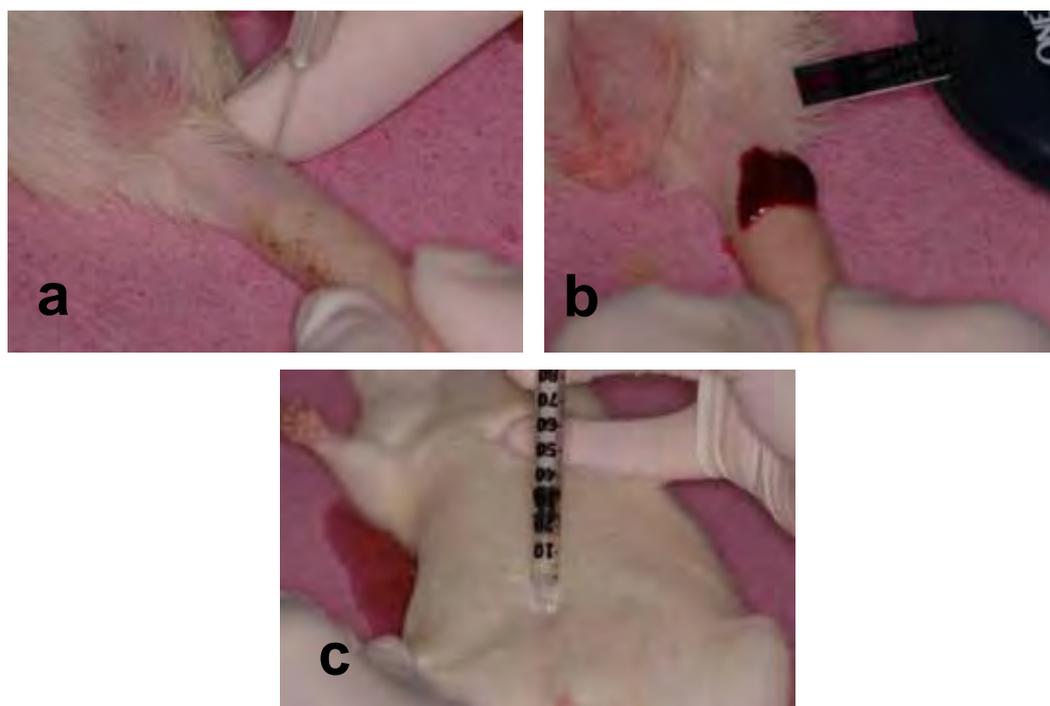


Figura 1 - Indução da diabetes experimental: a) perfuração da veia caudal; b) aferição da glicemia pré indução; c) administração via intraperitoneal da solução de aloxana monohidratada;

Doze horas após a administração da aloxana, foi oferecido aos animais glicose (Gli instant, Lowçucar) na concentração de 60 g por litro de água *ad libitum*, para prevenir hipoglicemia (de Amorim et al., 2008).

Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram no dia da cirurgia e no dia da eutanásia glicemia superior a 200 mg/dl após 12 h de jejum.

Os animais do grupo controle foram submetidos à administração via intraperitoneal de solução salina estéril na dose de 1ml/kg de peso do rato, simulando a indução da DM. Estes animais não receberam glicose.

4.4 Procedimentos cirúrgicos

As cirurgias para a obtenção e fixação dos enxertos foram realizadas 15 dias após a indução da diabetes. O osso parietal foi a área doadora, enquanto o ângulo mandibular foi a área receptora

4.4.1 Tricotomia e anti-sepsia

Todos os animais selecionados tiveram as regiões temporal, parietal e frontal e parotídeo-massetérica bilaterais tricotomizadas por meio de lâminas de barbear seguido de anti-sepsia com solução de gluconato de clorexidina 0,2%.

4.4.2 Anestesia Local

Para a realização das cirurgias, foi realizado também a administração subperiosteal de 0,1 ml de anestésico local Lidocaína 2%

(Lidovet, Uso veterinário, Bravet) sobre o osso parietal que foi a área doadora de osso autógeno, e sobre a região do ângulo da mandíbula, a área receptora, com o objetivo de analgesia pós operatória.

4.4.3 Execução do enxerto

Todos os animais foram submetidos a enxertos na hemimandíbula direita e esquerda (Donos et al., 2002). Os enxertos na hemimandíbula do lado esquerdo foram recobertos por membrana de colágeno reabsorvível (BioGide®, Geistlich Pharmaceutical, Wollhusen, Suíça), propiciando o recobrimento de todo o bloco enxertado (Grupos D-ME e C-ME). Os enxertos realizados na hemimandíbula do lado direito foram realizados da mesma maneira, porém sem o recobrimento pela membrana de colágeno (Grupos D-E e C-E) (Figura 2).

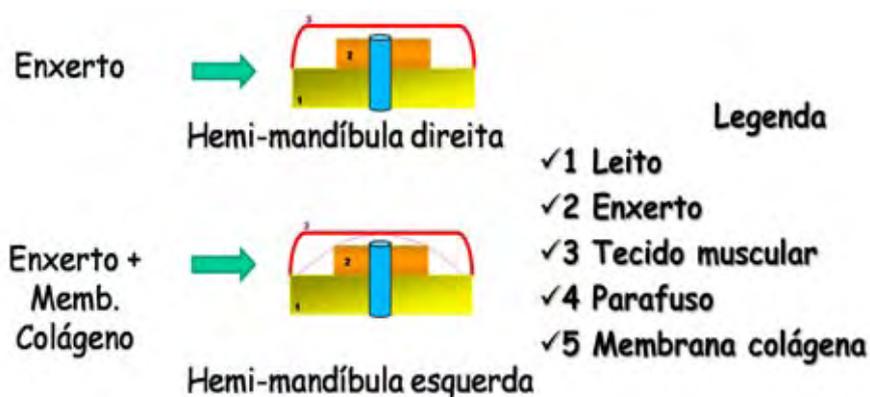


Figura 2 - Esquema representativo do resultado cirúrgico

Para a remoção do enxerto ósseo, assim como para a realização das perfurações foi utilizado contra ângulo redutor 20:1 Kavo

Koncept e um motor elétrico (Dentflex D Force 1000) com velocidade controlada em 600 rpm, e refrigeração com fluxo constante de soro fisiológico estéril.

Para obtenção dos enxertos ósseos foi realizada incisão linear de aproximadamente 2,0 cm no centro da calvária do animal, expondo os ossos parietais dos dois lados, para remoção de um enxerto de cada lado. Foram retirados dois blocos de enxerto com o auxílio de uma broca tipo trefina com diâmetro externo de 4,1 mm (Neodent – Brasil) sob abundante irrigação com solução fisiológica (Figura 3).

As lojas cirúrgicas criadas no osso parietal foram recobertos pelo periósteo e camada muscular suturados com fio 5,0 absorvível de poliglactina 910 (Ethicon – Johnson & Johnson) e em seguida a pele com fio de seda 4.0 (Ethicon – Johnson & Johnson).

Após a remoção, os enxertos foram perfurados no seu centro com uma broca tipo lança 1,0 mm de diâmetro e fresa helicoidal de 1,2 mm de diâmetro (Conexão Sistema de prótese Ltda – Brasil) em baixa rotação, refrigerada com soro fisiológico, para fixação do mesmo ao leito receptor por meio de parafuso cortical de fixação auto-rosqueante de titânio (Figura 4).

Os enxertos foram atravessados pelo parafuso cortical de fixação auto-rosqueante de titânio com 2,0 mm de diâmetro de cabeça, 1,5 mm de diâmetro de corpo e 2,6 mm de comprimento (Conexão Sistema de prótese Ltda – Brasil) para fixação do conjunto, parafuso e enxerto, na mandíbula direita e o conjunto parafuso, membrana colágena e enxerto na mandíbula do lado esquerdo (Figura 5).

Na mandíbula, área receptora, foi realizada incisão linear na pele, de extensão aproximada de 1,5 cm, paralela ao arco zigomático, entre o ângulo da boca ao ângulo da mandíbula dos dois lados, visualizando o músculo masseter, que foi divulsionado, utilizando-se instrumentos desenvolvidos especialmente para esta finalidade, até

atingindo a face lateral da mandíbula. Foi realizada a perfuração com broca tipo lança 1,0 mm de diâmetro e fresa helicoidal de 1,2 mm de diâmetro (Conexão Sistema de prótese Ltda – Brasil) em baixa rotação, refrigerada com soro fisiológico, por meio de parafuso cortical de fixação auto-rosqueante de titânio, a fim de permitir a fixação do enxerto ósseo e da membrana colágena de acordo com o grupo experimental (Figura 6).

Para a hemi-mandíbula do lado esquerdo, a membrana colágena foi posicionada entre o enxerto e a cabeça do parafuso para que a membrana ficasse estabilizada e recobrisse completamente o bloco de enxerto (grupos D-ME e C-ME) (Figura 6).

As membranas de colágeno foram recortadas de maneira uniforme utilizando uma matriz de alumínio medindo 7 x 7 mm.

Após a fixação e estabilização dos enxertos, com ou sem recobrimento pela membrana colágena, foram realizadas suturas por planos, suturando-se primeiramente a camada muscular com fio 5,0 absorvível de poliglactina 910 (Ethicon – Johnson & Johnson) e posteriormente a pele com fio de seda 4.0 (Ethicon – Johnson & Johnson) (Figura 6).

Em seguida foi realizada a limpeza das regiões operadas com solução de clorexidina 0,2%. Após a cirurgia, os animais receberam dieta normal e água “ad libitum”.

4.4.4 Antibiótico

Após os procedimentos cirúrgicos para a realização dos enxertos ósseos, todos os animais receberam dose única de 1 mg de

antibiótico/Kg de peso no animal (Pentabiótico Veterinário – Fort Dodge) por via intramuscular.

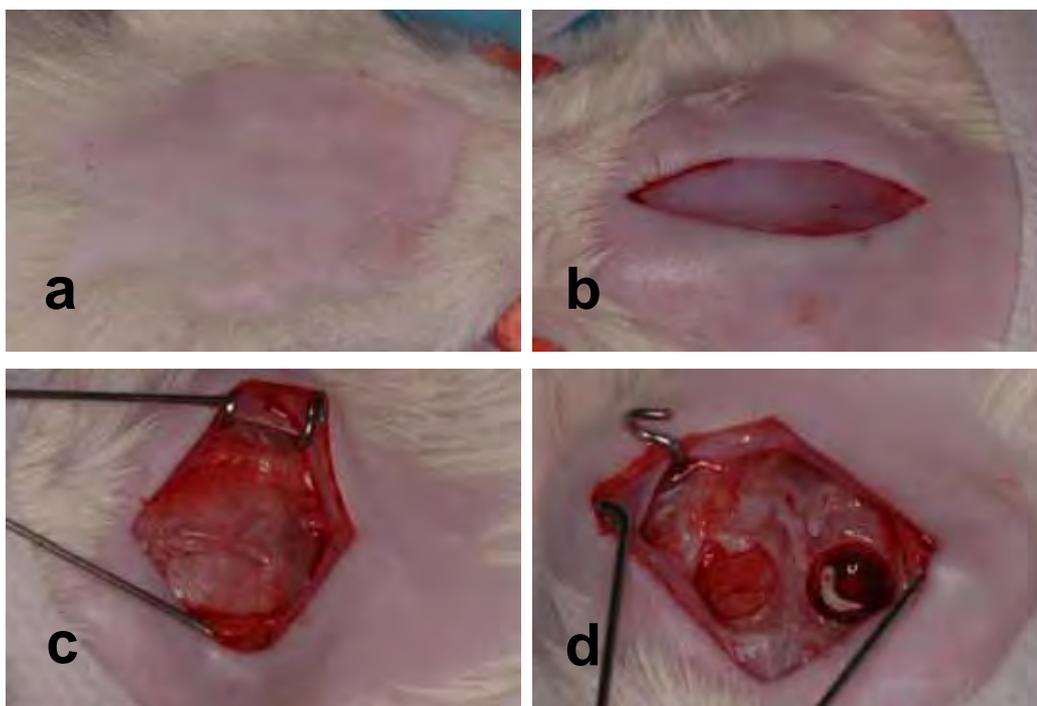


Figura 3 - Exposição e preparo do leito doador: a) tricotomia e desinfecção; b) incisão linear; c) divulsão muscular e exposição do osso parietal; d) área doadora do enxerto.

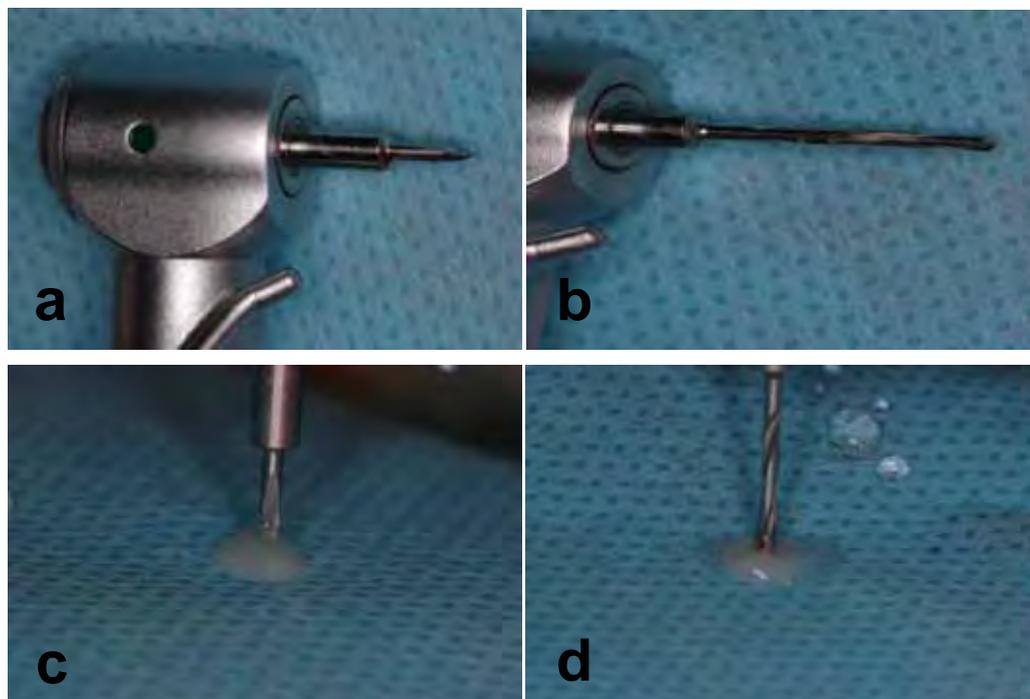


Figura 4 - Preparo do enxerto: a) broca tipo lança 1,0 mm de diâmetro; b) fresa helicoidal de 1,2mm; c) perfuração inicial do enxerto; d) alargamento da perfuração.

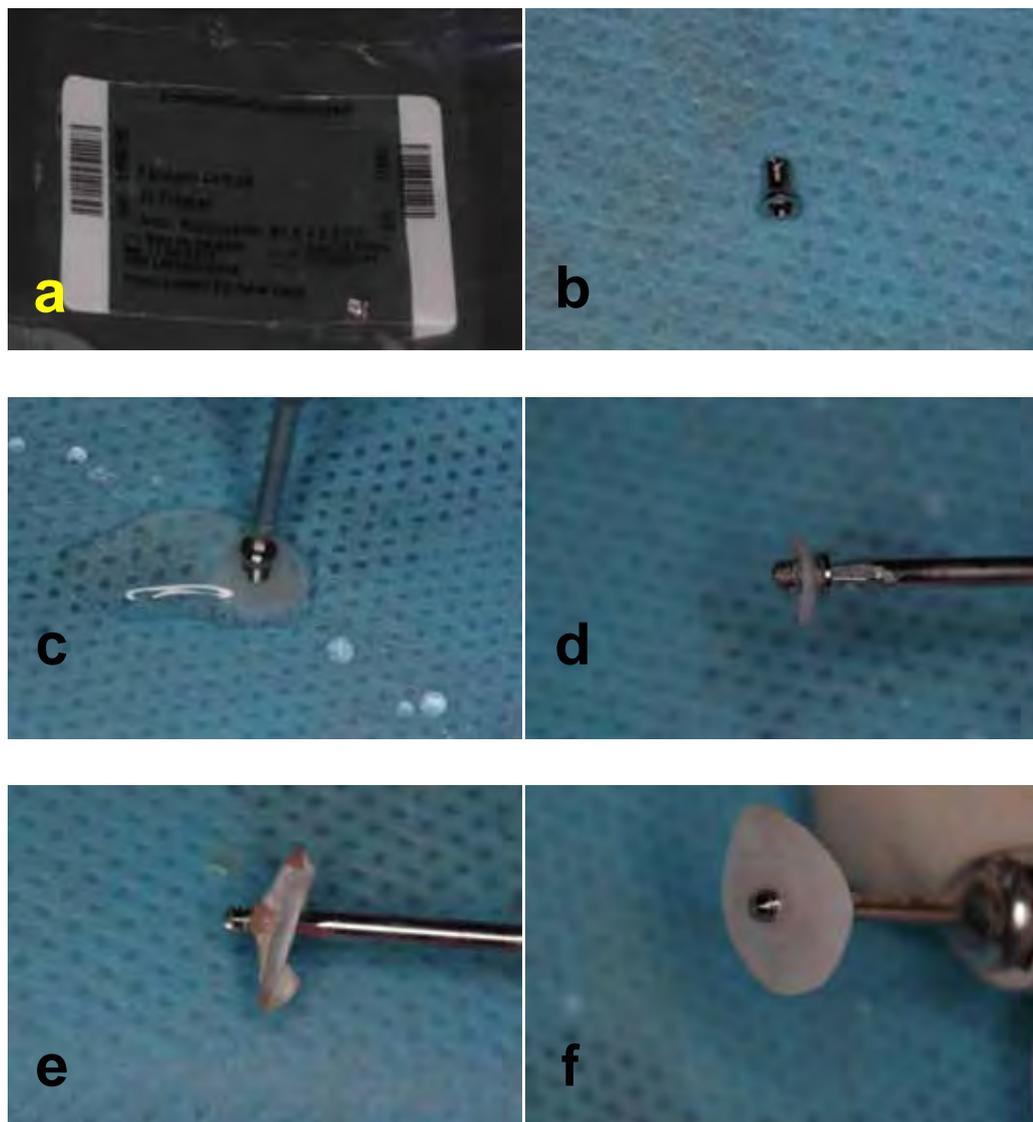


Figura 5 - Fixação do parafuso ao enxerto: a,b) parafuso cortical de fixação auto rosqueante de titânio; c, colocação do parafuso no enxerto; d) conjunto parafuso e enxerto; e) colocação do parafuso na membrana colágena; f) conjunto parafuso, membrana colágena e enxerto.

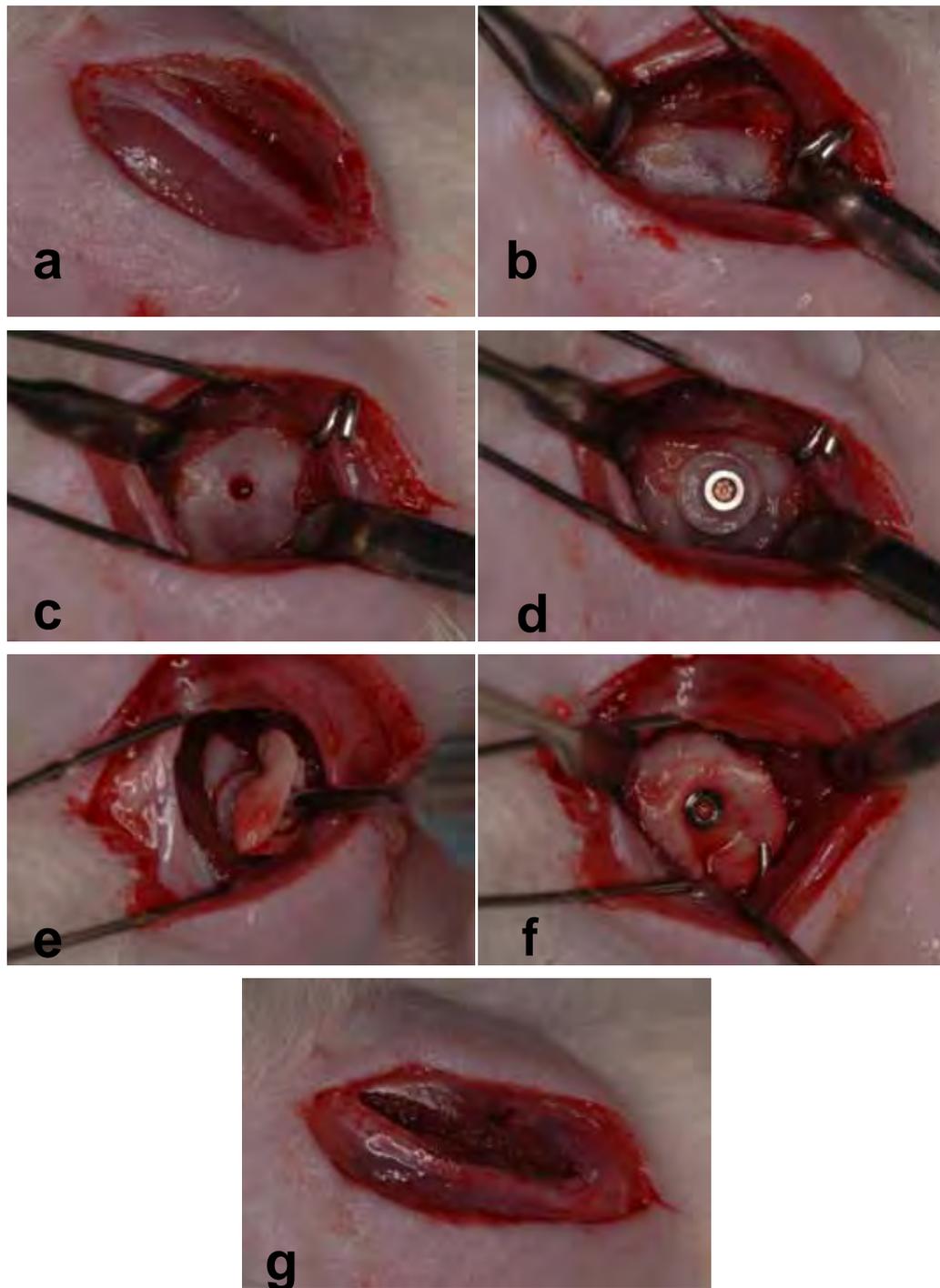


Figura 6 - Exatificação e preparo do leito receptor: a) tricotomia e desinfecção; b) incisão linear; c) divulsão muscular e exposição do osso parietal; d) área doadora do enxerto; e, f) recobrimento da loja óssea cirúrgica com membrana colágena reabsorvível; g) sutura periósteo e camada muscular.

4.4.5. Eutanásia

Os animais foram anestesiados, e realizado a perfusão cardíaca com formalina 4%.

A eutanásia de 5 animais por grupo experimental foi realizada nos seguintes períodos: 0 hora, 7, 14, 21, 45 e 60 dias.

4.5 Processamento histológico

De acordo com o grupo e período de cada rato, as hemimandíbulas foram removidas e armazenadas para fixação em solução de formaldeído a 10%, tamponado, durante um período máximo de 48 horas. Cada espécime foi catalogada e codificada.

4.5.1 Desmineralização das peças cirúrgicas

As peças foram desmineralizadas com solução de EDTA 10%, pH 7,4 em aparelho de micro-ondas (PELCO 3441, Ted Pella, Inc., CA, USA), (Madden, Henson, 1997), pertencente ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade São Leopoldo Mandic, em Campinas. Para tanto, os espécimes foram armazenados em um recipiente contendo EDTA, que por sua vez era colocado em um segundo recipiente contendo gelo triturado para que se mantivesse a

temperatura em 33 °C durante a realização dos ciclos. O conjunto era então levado ao aparelho de micro-ondas e submetido a ciclos de 15 min com troca do gelo entre os ciclos e troca do EDTA a cada 1 h (4 ciclos) (Figura 7).



Figura 7 aparelho de micro-ondas PELCO 3441, (Ted Pella, Inc., CA, USA)

4.5.2 Preparo das lâminas para análise histológica e histomorfométrica

Com a desmineralização completa das peças, os parafusos foram removidos, e as peças foram incluídas inteiras em bloco de parafina. Os blocos foram submetidos a cortes semi-seriados, com 5µm de espessura, sendo 5 cortes consecutivos por lâmina, com níveis de intervalos de 350 µm entre os níveis de corte, resultando num total de 8 a 9 níveis e lâminas por espécime. Estas lâminas foram coradas com

Hematoxilina e Eosina (HE – Merck & Co, Inc.) para a análise histológica e histomorfométrica (Figura 8).

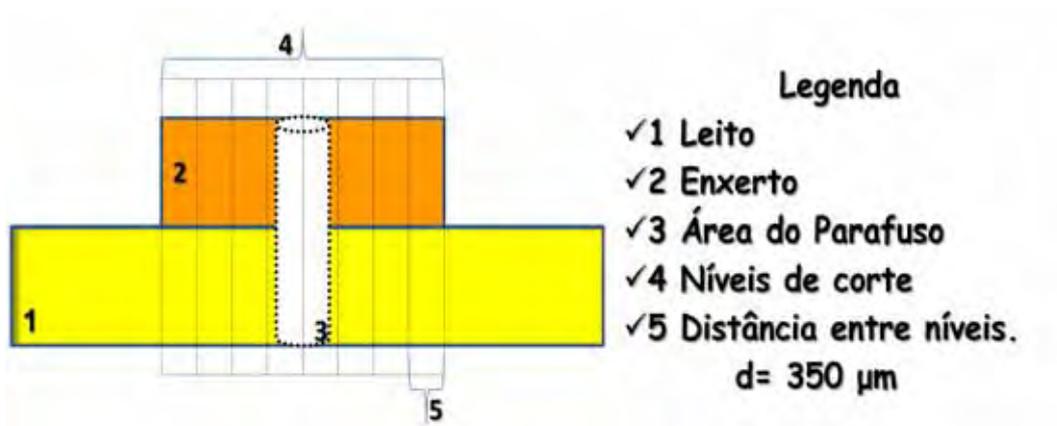


Figura 8 - Esquema representativo dos cortes histológicos.

4.6 Análise Microscópica

A análise microscópica foi feita através da captura de imagens das lâminas a partir de um microscópio de luz Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) que as transmite para o programa computacional AxioVision Release 4.7.2.

As estruturas analisadas foram: matriz óssea do leito receptor e enxerto, matriz óssea neoformada na interface leito receptor e enxerto e ao redor do enxerto, osteócitos, osteoblastos, osteoclastos, tecido conjuntivo interposto entre leito receptor e enxerto e ao redor do enxerto, espaços medulares.

4.6.1 Análise histológica

Foram utilizados para a análise os níveis de cortes mais próximos às bordas da perfuração com distância de 1400 μm entre os níveis. A análise histológica foi realizada inicialmente em pequeno aumento para ter uma visibilidade global dos cortes. Foi realizada a ampliação para observar os detalhes de cada área, e feito uma análise qualitativa dos tecidos. Foram avaliados os seguintes aspectos dos cortes: características do leito receptor (características gerais como tipo de osso, áreas de reabsorção e neoformação); em seguida, a interface leito-enxerto quanto à presença de áreas de reabsorção e neoformação óssea, tecido conjuntivo interposto, integração e integridade do enxerto com o leito.

4.6.2 Análise Histomorfométrica

Para a análise, utilizou-se lâminas de todos os grupos, nos dois níveis mais próximos as bordas da perfuração com distância de 1400 μm entre os níveis.

Em cada nível de corte selecionado, foi obtida uma imagem global do corte histológico (25x) para avaliação do posicionamento do enxerto no leito e altura do enxerto. Foram realizadas também imagens das bordas laterais do enxerto do lado direito e do lado esquerdo para avaliação da matriz óssea neoformada sobre o leito receptor e ao redor do enxerto (100x). Duas imagens posicionadas entre

o centro e as laterais do enxerto em que foi possível avaliar a área de integração entre leito receptor e enxerto também foram feitas.

As imagens foram arquivadas em formato JPEG, e submetidas à análise histomorfométrica com utilização do programa computacional NIH Image J 1.35s, de domínio público. Tal programa possibilitou delimitação da altura do enxerto, a quantidade de matriz óssea neoformada e delimitação da área de integração do enxerto com o leito.

As imagens possuíam códigos que não permitiram a identificação do grupo experimental ao qual pertenciam, possibilitando uma análise cega dos dados. Estes foram tabulados e submetidos à análise estatística.

4.6.2.1 Análise Histomorfométrica da altura do enxerto

Para a delimitação da altura do enxerto, foram utilizadas as fotos em menor aumento (25x), com escala em barra no comprimento de 500 μm obtida e calibrada pelo programa computacional AxioVision Release 4.7.2. Através do programa computacional NIH Image J 1.35s com a ferramenta "Straight line selection" selecionou-se uma linha sobre a barra da escala, a distância conhecida na escala era de 500 μm obtendo distância em pixel padronizada de 248,00, calibrando a ferramenta em 0,496 pixel/ μm (Figuras 9 e 10).

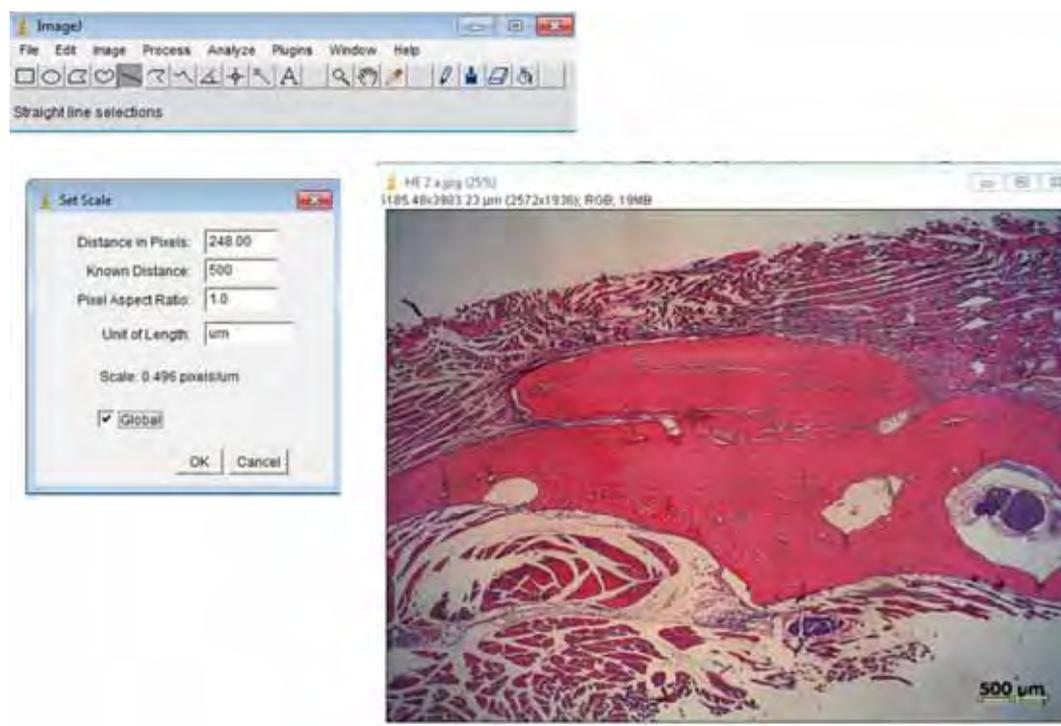


Figura 9 – Representação da calibração do programa computacional NIH Image J 1.35s para a análise da altura do enxerto.

A partir da padronização dessa ferramenta, foi medida a altura do enxerto, nas fotos dos cortes histológicos de todos os níveis das peças cirúrgicas obtidas de todos os ratos, padronizando uma linha perpendicular da superfície até a base, no centro do enxerto. Os resultados foram tabelados e submetidos à análise estatística.

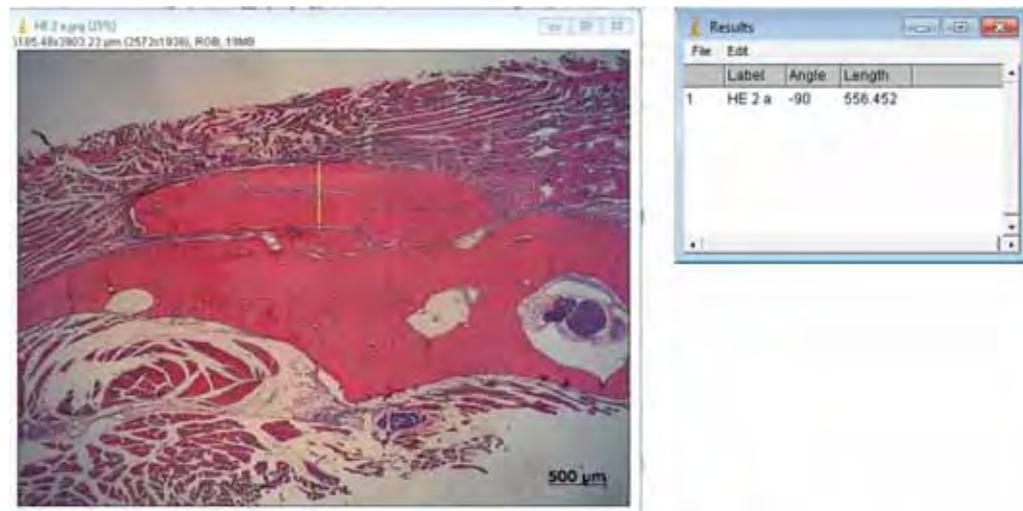


Figura 10 – Representação da medida e resultado da altura do enxerto.

4.6.2.2 Análise histomorfométrica da neoformação óssea nas bordas do enxerto

Para avaliação da quantidade de osso neoformado nas bordas laterais do enxerto, as microfotografias foram realizadas com as bordas laterais do enxerto centralizadas na imagem (100x).

A delimitação da neoformação óssea ao redor do enxerto foi realizada através da ferramenta “Grid” do programa computacional NIH Image J 1.35s padronizando uma divisão de cada fotografia em 25 colunas por 20 linhas, totalizando 500 pontos de intersecção (Figura 11).

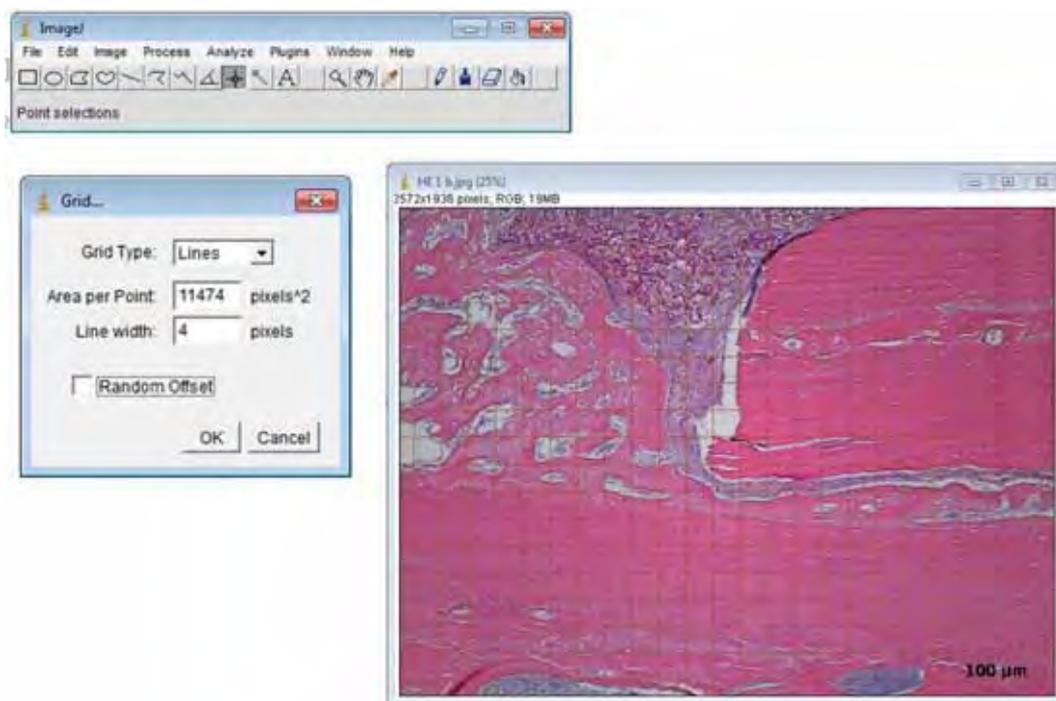


Figura 11 – Representação da calibração do programa computacional NIH Image J 1.35s para a análise da neoformação óssea ao redor do enxerto.

Os pontos de intersecção que coincidiam com a área de neoformação óssea nas bordas laterais do enxerto, foram contados através da ferramenta “point selection”. Os dados de cada corte histológico foram tabelados e submetidos a análise estatística (Figura 12).

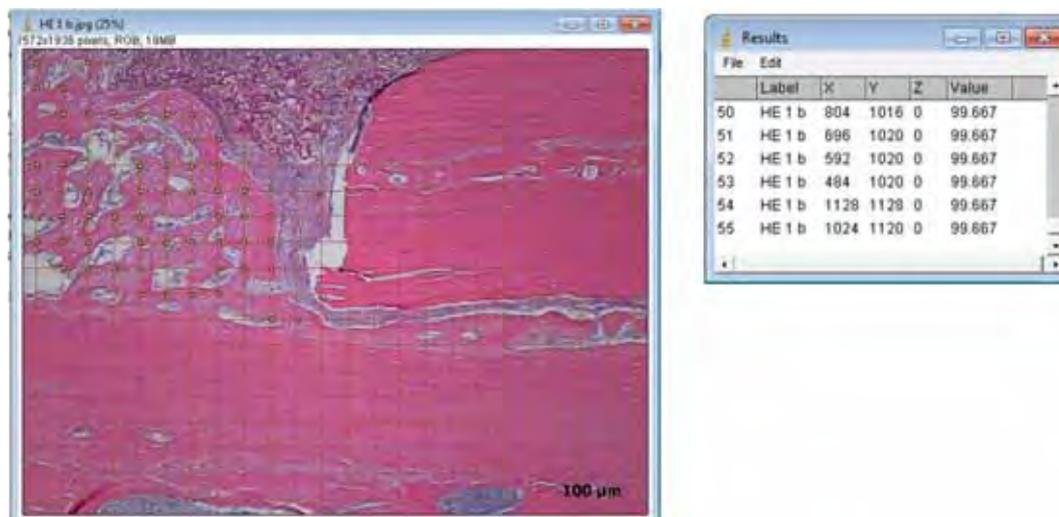


Figura 12 – Representação da marcação dos pontos de intersecção no grid com neoformação óssea ao redor do enxerto e resultado.

4.6.2.2 Análise histomorfométrica da área de integração do enxerto ao leito receptor

Para a avaliação da integração do enxerto ao leito receptor, foram realizadas duas imagens posicionadas entre o centro e as laterais do enxerto.

Para a delimitação da superfície de integração do enxerto ao leito receptor, utilizou-se aumento de 100x, com escala em barra no comprimento de 100 μm obtida e calibrada pelo programa computacional AxioVision Release 4.7.2. Através do programa computacional NIH Image J 1.35s, com a ferramenta “Segmented line selection” selecionou-se uma linha sobre a barra da escala, a distância conhecida na escala era de 100 μm obtendo distância em pixel padronizada de 184,00, calibrando a ferramenta em 1,840 pixel/ μm (Figura 13).

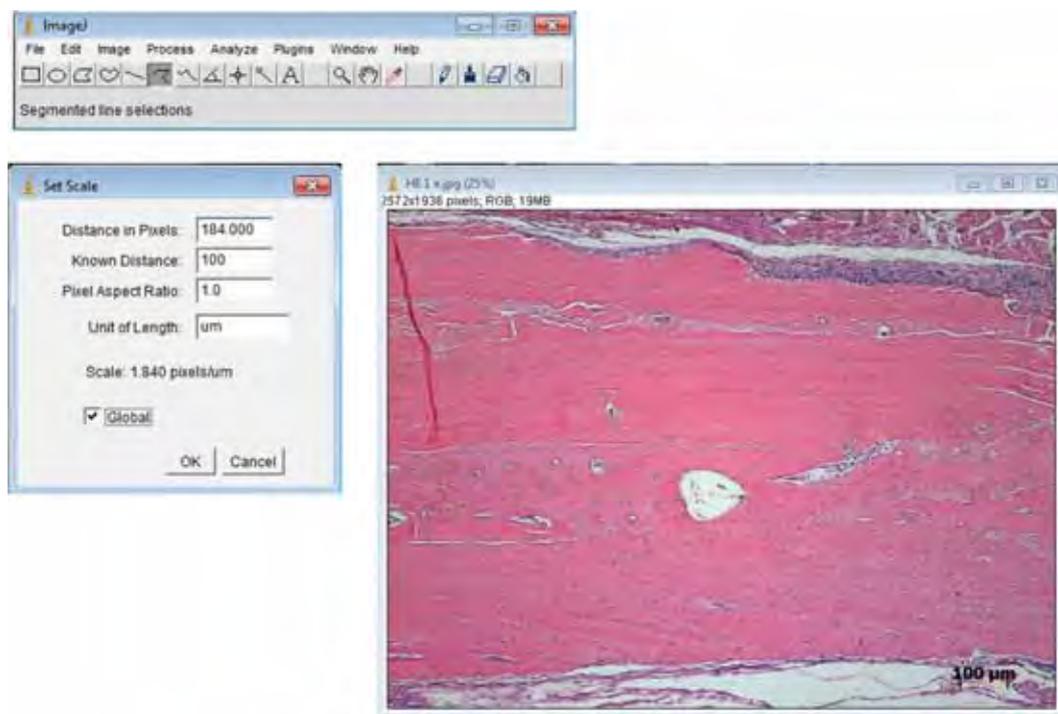


Figura 13 – Representação da calibração do programa computacional NIH Image J 1.35s para a análise da área de osseointegração leito-enxerto.

A partir dessa padronização, avaliou-se as áreas de integração do enxerto ao leito receptor. As medidas foram realizadas através da ferramenta “Segmented line selection” do programa computacional NIH Image J 1.35s, padronizando uma linha na região em que ocorreu integração óssea entre o leito receptor e o enxerto, não medindo regiões que encontrava tecido conjuntivo interposto. Os resultados foram tabelados e submetidos à análise estatística (Figura 14).

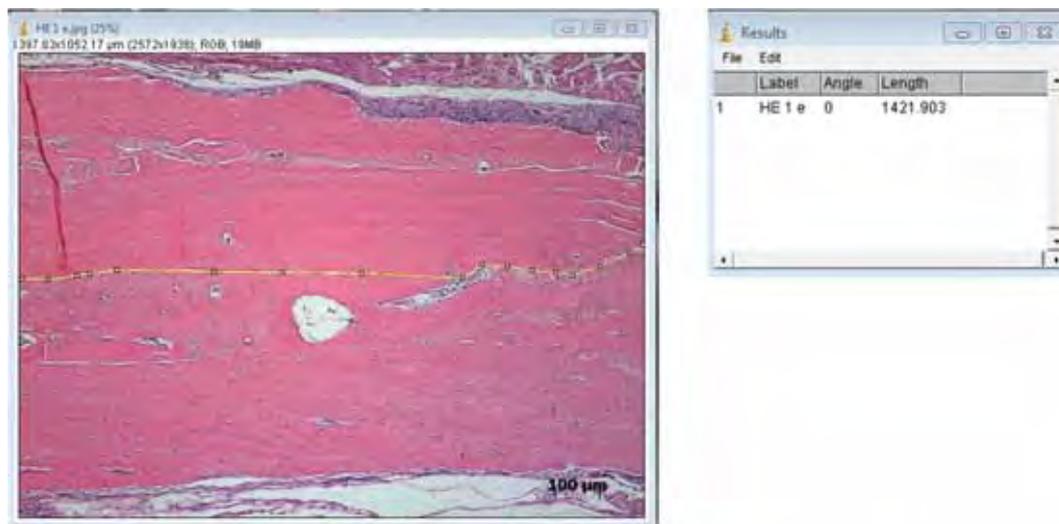


Figura 14 – Representação da medida e resultado da área de osseointegração leito-enxerto.

4.7 Delineamento experimental e análise estatística

A análise estatística realizada obedeceu a uma estrutura fatorial tipo 2 x 2 x 6, sendo as variáveis experimentais, ou fatores de estudo, a condição dos animais Diabético (D) ou Controle (C), o tratamento realizado, a membrana de colágeno quanto à sua ausência (E) ou presença (ME) no recobrimento do enxerto e os períodos de sacrifício (zero, 7, 14, 21, 45 e 60 dias).

As variáveis resposta foram os valores da altura do enxerto, a neoformação óssea na borda lateral do enxerto e a superfície de integração dos enxertos ao leito receptor, obtidas através do programa computacional NIH Image J 1.35s, de domínio público.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio do programa computacional: MINITAB (Minitab, version 14.12, 2004).

A estatística descritiva consistiu no cálculo de médias e desvio padrão, enquanto que a estatística inferencial foi realizada através da análise de variância (ANOVA) 3 fatores (efeito fixo) e teste de Tukey, ambos ao nível de significância convencional de 5%.

O estudo do efeito interação condição x tratamento x período de eutanásia foi conduzido por meio do gráfico de médias realizado no programa computacional Microsoft Office Excel 2007 for Windows.

5 RESULTADOS

Todos os ratos operados foram analisados, a cicatrização cirúrgica ocorreu sem complicações. Os animais que foram induzidos à DM apresentaram , 14 dias após a indução, no dia da cirurgia e no dia da eutanásia, glicemia superior a 200 mg/dL.

Os animais induzidos ao diabetes dos grupos 45 e 60 dias após a indução apresentaram perda de peso comparado ao dia da indução, sendo essa perda de peso maior nos ratos que apresentaram valores de glicemia mais altos. Nesses ratos também observou-se retinopatia e dificuldade de cicatrização. Para os ratos controle, houve ganho de peso e manutenção da glicemia com a evolução do período (Figura 15).

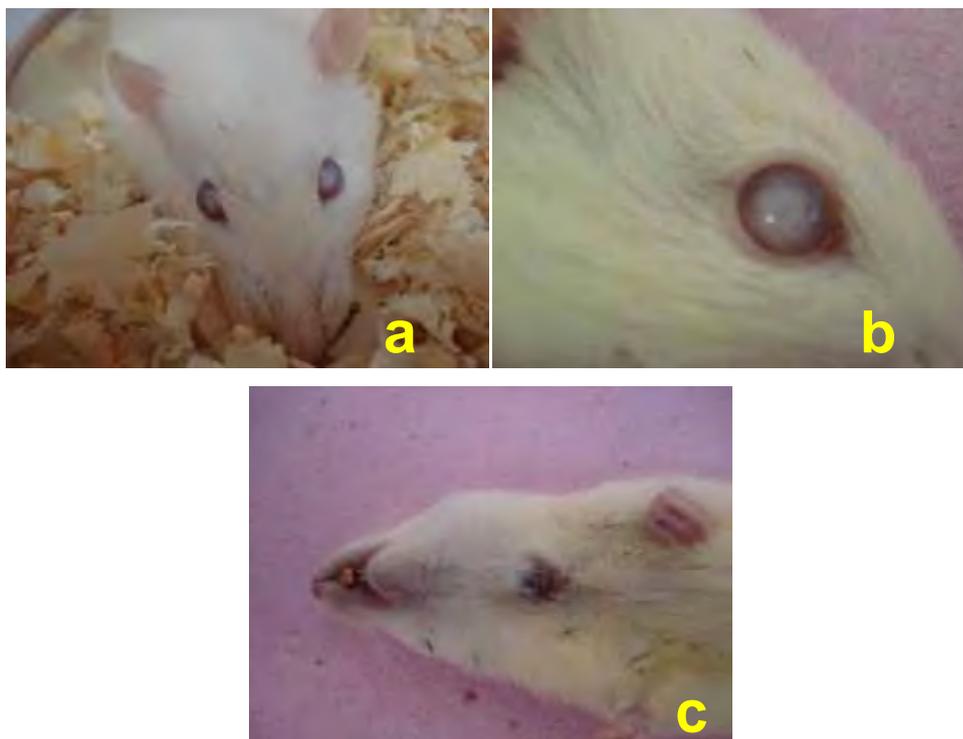


Figura 15 – Rato diabético. a) e b) Retinopatia; c) Dificuldade de cicatrização.

5.1 Análise descritiva

5.1.1 Dia 0

Nesse período observou-se que os ratos diabéticos (D) apresentavam tanto no leito receptor quanto no enxerto maior quantidade de espaços medulares quando comparado com os ratos do grupo controle (C). Para todos os grupos em que foi utilizada a membrana (D-ME e C-ME), observou-se que esta recobria todo o enxerto e parte do leito.

5.1.2 Dia 7

Nesse período observou-se que os ratos diabéticos (D-E e D-ME) apresentavam tanto no leito receptor quanto no enxerto, maior quantidade de espaços medulares quando comparado com os ratos controle (C-E e C-ME). Alguns espécimes apresentaram discreta neoformação óssea sendo um rato no grupo controle, sem o recobrimento pela membrana (C-E), em quatro ratos diabéticos, sendo 3 ratos sem membrana (D-E). Esse tecido ósseo neoformado apresentou superfície recoberta por numerosos osteoblastos. Em todos os ratos em que o enxerto não foi recoberto pela membrana (D-E e C-E), observou-se tecido conjuntivo interposto, com características de tecido mais imaturo.

5.1.3 Dia 14

Nesse período observou-se que os ratos diabéticos (D-E e D-ME) apresentavam tanto no leito receptor quanto no enxerto, maior quantidade de espaços medulares quando comparado com os ratos controle (C-E e C-ME). Todos os espécimes apresentaram tecido conjuntivo interposto fibroso e vascularizado. A partir desse período pode-se observar neoformação óssea nas bordas do enxerto e na interface leito-enxerto discretos pontos de união. De todos os espécimes, apenas um rato de cada grupo não apresentou neoformação óssea. O osso neoformado apresentava osteócitos volumosos e superfície recoberta por

numerosos osteoblastos. Um rato diabético com a membrana (D-ME), apresentou neoformação óssea na base do enxerto.

5.1.4 Dia 21

A partir desse período, começou-se a observar reabsorção das bordas laterais do enxerto, especialmente nos grupos não recobertos pela membrana (C-E e D-E). Observou-se também maior neoformação óssea tanto na interface leito-enxerto como ao redor do enxerto. Neste último caso, um espécime controle e um diabético, ambos sem a membrana (C-E e D-E), mostraram integração parcial do enxerto ao leito.

Na interface leito-enxerto, a quantidade de tecido conjuntivo interposto foi menor quando comparada ao período anterior, e pode-se também observar que houve menor quantidade desse tecido nos espécimes recobertos pela membrana (C-ME e D-ME). Nessa mesma região, observou-se maiores áreas de integração enxerto ao leito, quando comparado ao período 14 dias. Nesse caso, observou-se que 6 espécimes recobertos pela membrana (3 controle (C-ME) e 3 diabéticos (D-ME)) mostraram integração do enxerto ao leito, ao passo que apenas 4 não recobertos pela membrana apresentaram o mesmo padrão (2 controles (C-ME) e 2 diabéticos (D-ME)).

O osso neoformado nos ratos diabéticos (D-E e D-ME) mostrou-se mais trabecular que o apresentado pelos ratos controle (C-E e C-ME), assim como o osso do enxerto e do leito receptor.

5.1.5 Dia 45

Todos os enxertos recobertos pela membrana (D-ME e C-ME) estavam integrados ao leito receptor, enquanto dentre os espécimes em que a membrana não estava presente (D-E e C-E), apenas 3 do grupo controle e 3 do grupo diabetes apresentavam integração do enxerto ao leito.

A quantidade de tecido conjuntivo na interface leito-enxerto foi menor quando comparada ao período anterior. Dentre os quatro grupos, o que apresentou maior quantidade de tecido interposto foi o grupo dos ratos diabéticos cujo enxerto não foi recoberto pela membrana (D-E).

O enxerto dos grupos não recobertos pela membrana (D-E e C-E) exibiu reabsorção tanto das bordas laterais como da superfície voltada para a camada muscular, enquanto os recobertos pela membrana (D-ME e C-ME) apresentavam apenas discreta reabsorção das bordas laterais.

Houve reabsorção nas bordas laterais do enxerto e preenchimento por osso neoformado, sendo que nos grupos D-ME e C-ME, essa delimitação, por vezes, foi de difícil visualização.

Observou-se ainda que o osso neoformado nos grupos controle (C-E e C-ME) apresentavam osteócitos menores, enquanto o osso neoformado nos ratos diabéticos (D-E e D-ME) apresentavam maior quantidades de espaços medulares.

5.1.6 Dia 60

Todos os espécimes recobertos pela membrana (D-ME e C-ME) apresentaram osseointegração, enquanto os não recobertos do grupo controle (C-E) apenas em quatro foi observado. O grupo D-E apresentou 3 espécimes com osseointegração, e um espécime com pontos de integração leito-enxerto.

Os grupos C-E e D-E apresentaram reabsorção lateral e da superfície do enxerto, enquanto nos grupos C-ME e D-ME, observou-se que o enxerto apresentava discreta reabsorção.

Embora todos os espécimes tenham mostrado neoformação óssea lateral, apenas os do grupo controle (C-E e C-ME) mostraram neoformação óssea sobre o enxerto.

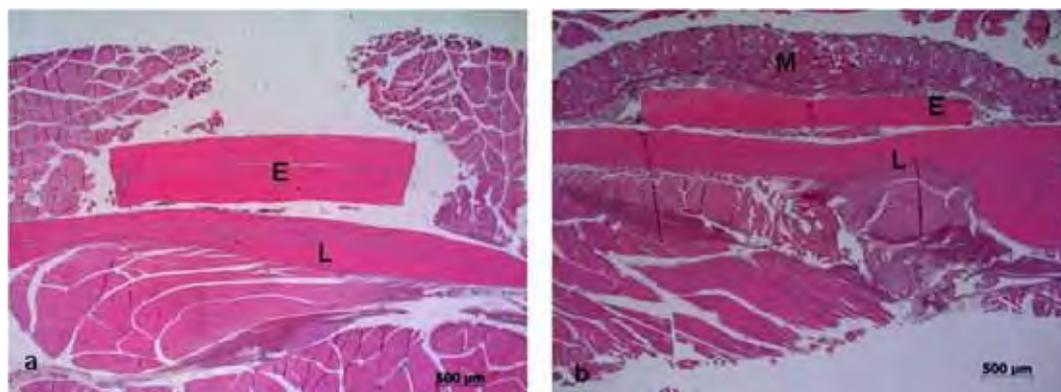


Figura 16 – Dia 0. a) Rato C-E; b) Rato C-ME. (E) Enxerto, (L) Leito receptor, (M) Membrana.

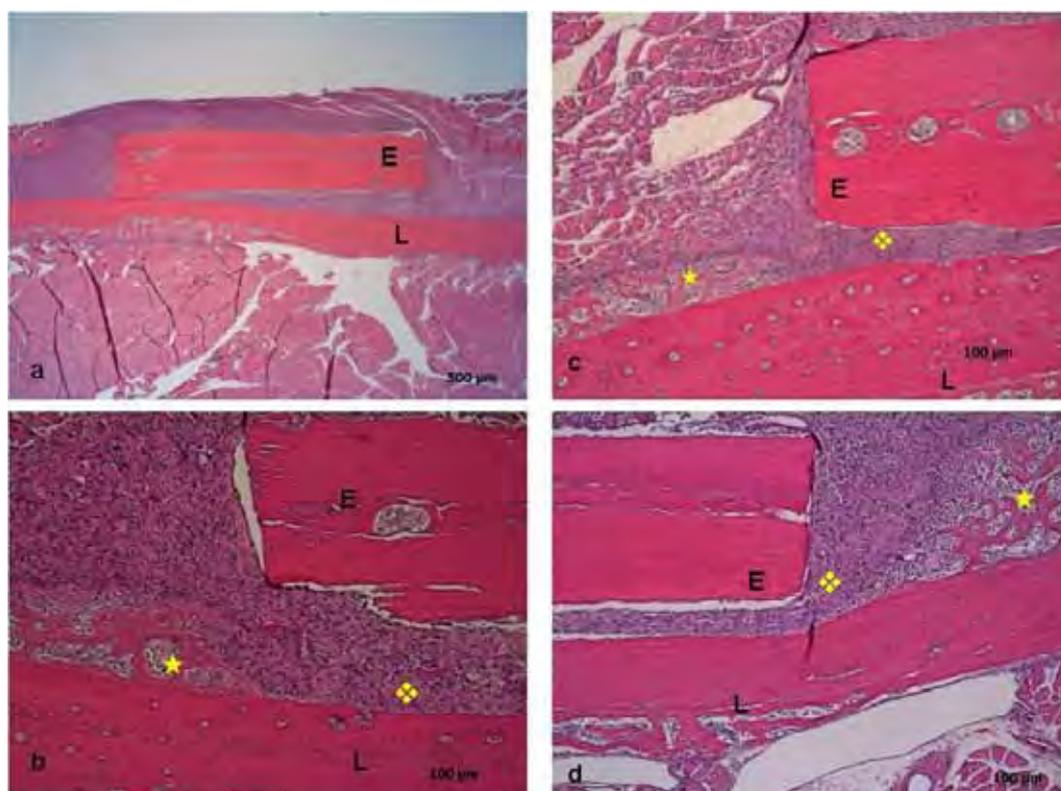


Figura 17 – Dia 7. a e b) Rato C-E; c e d) Rato D-E. (E) Enxerto, (L) Leito receptor, (★) neoformação óssea, (◆) Tecido conjuntivo.

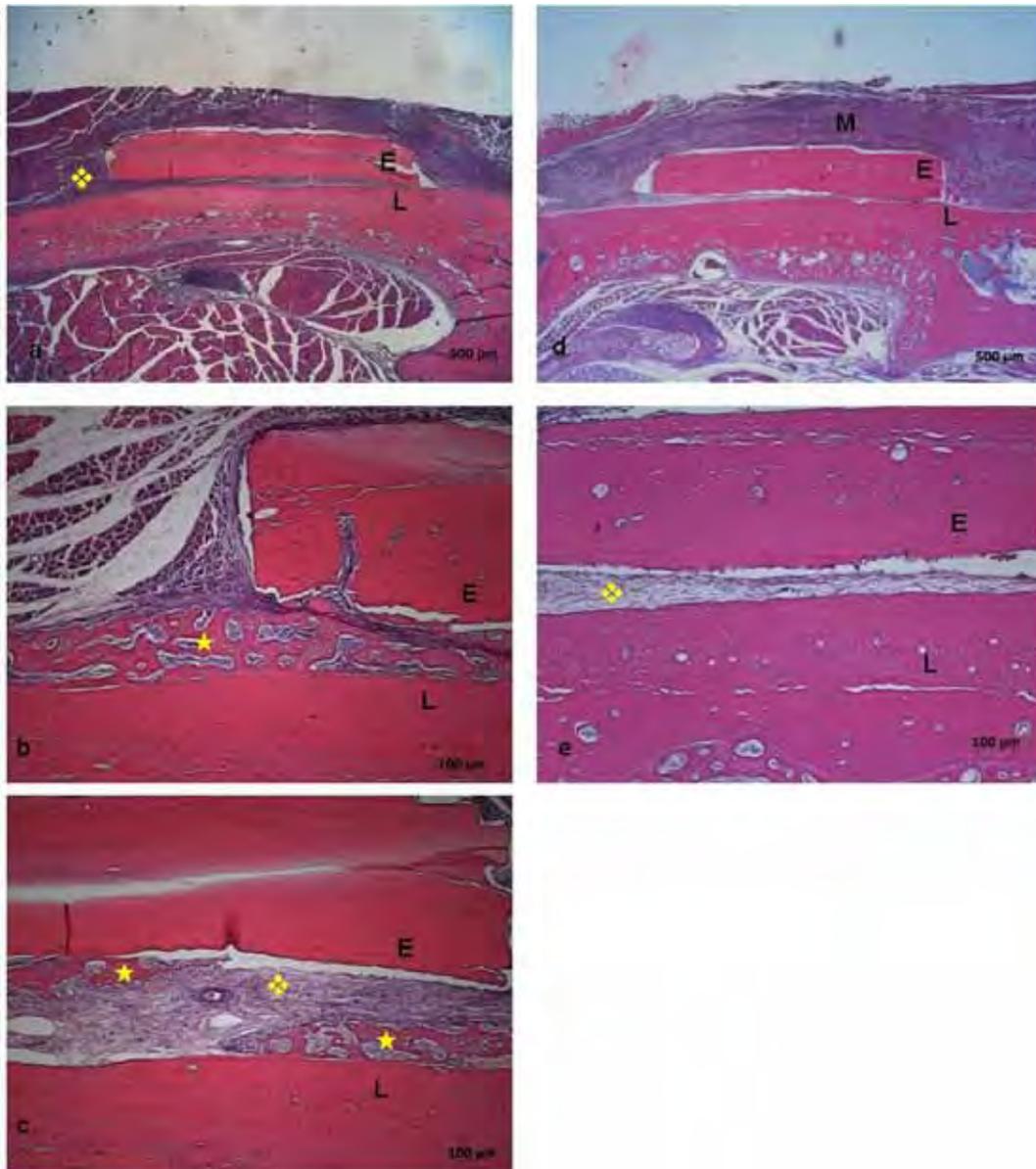


Figura 18 – Dia 14. a, b e c) Rato C-E; d e e) Rato D-ME. (E) Enxerto, (L) Leito receptor, (★) neoformação óssea, (❖) Tecido conjuntivo.

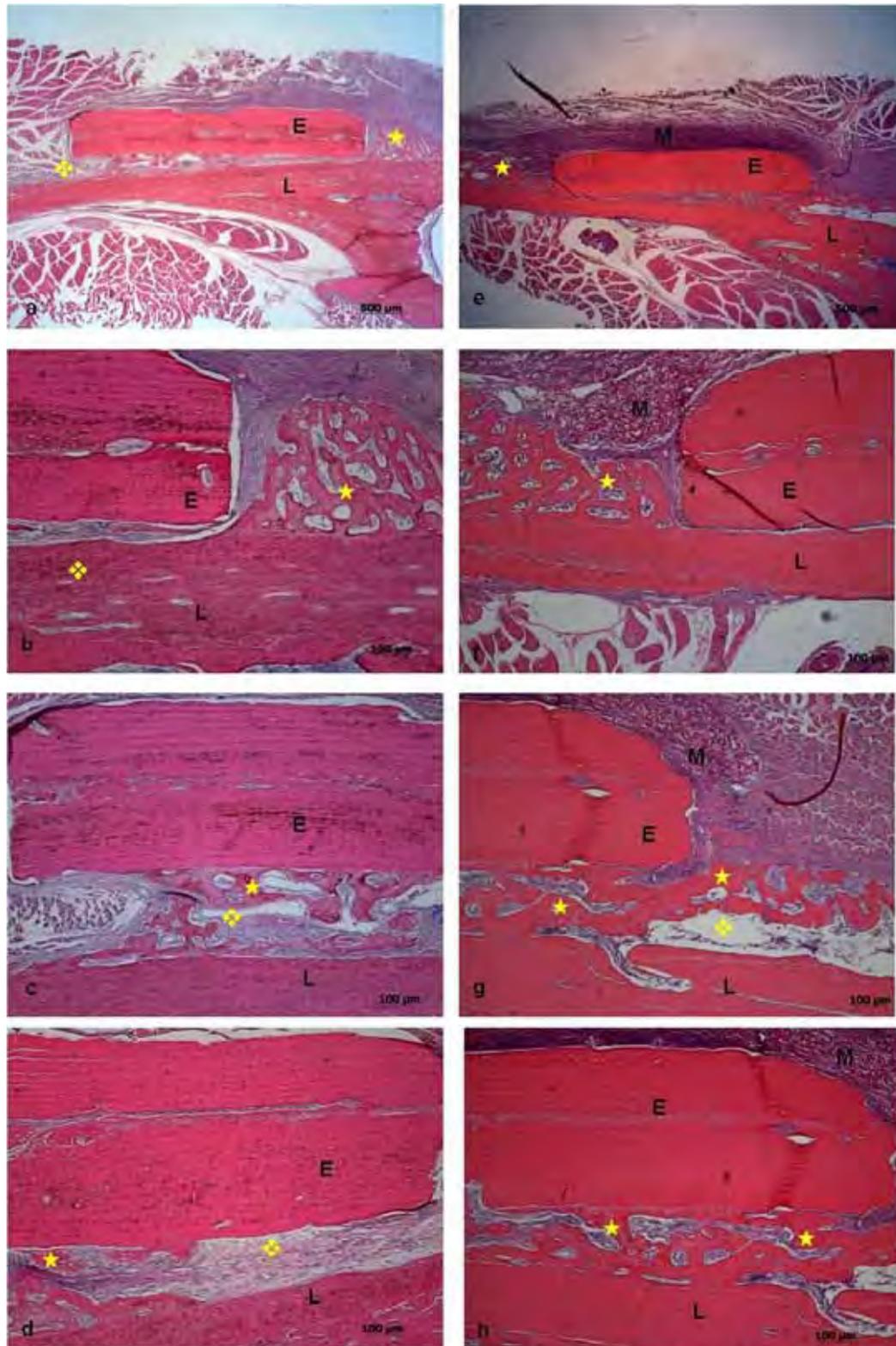


Figura 19 – Dia 21. a, b, c e d) Rato C-E; e, f, g e h) Rato C-ME. (E) Enxerto, (L) Leito receptor, (M) Membrana (★) neoformação óssea, (❖) Tecido conjuntivo.

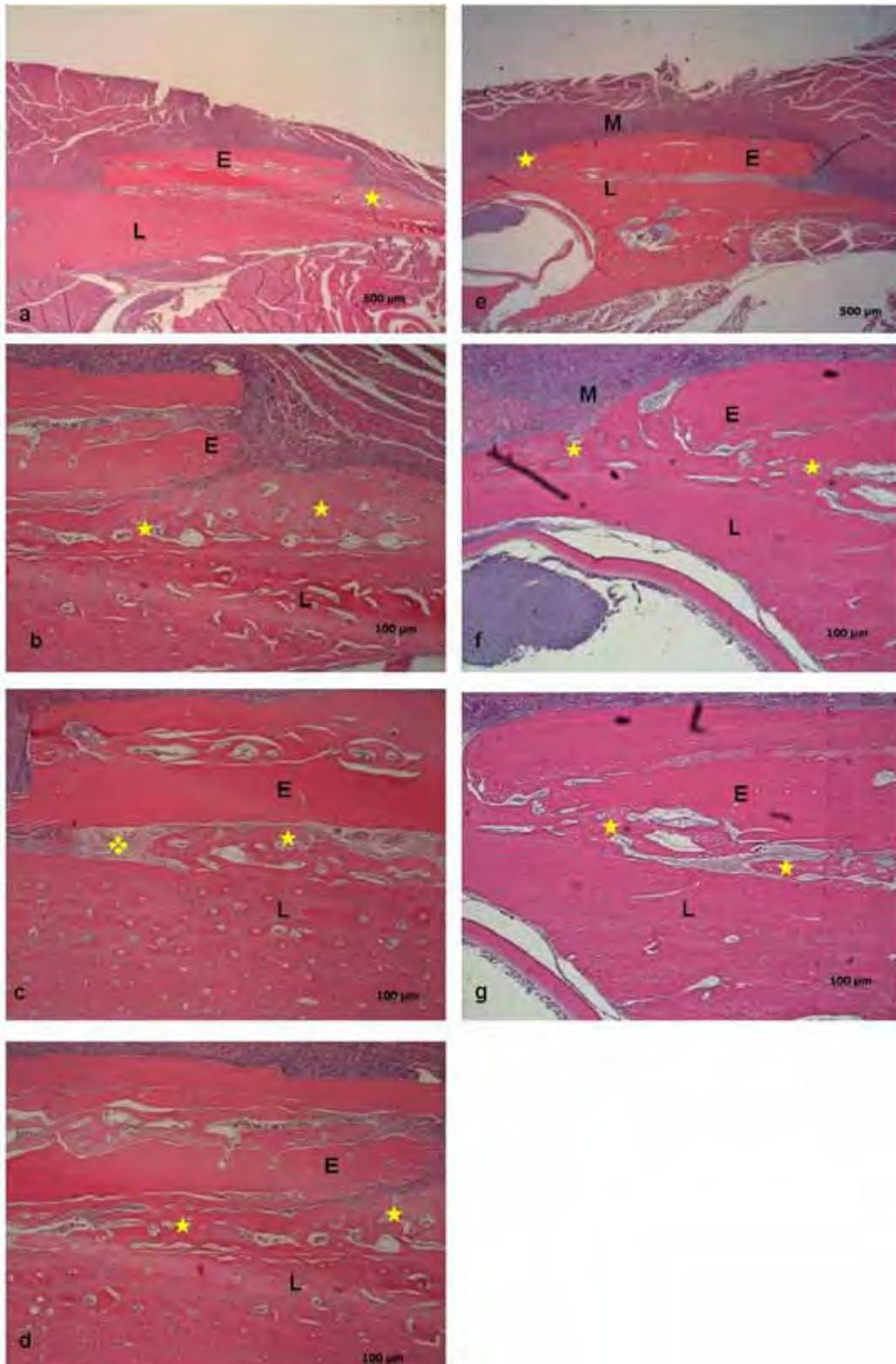


Figura 20 – Dia 21. a, b, c e d) Rato D-E; e, f, e g) Rato D-ME. (E) Enxerto, (L) Leito receptor, (M) Membrana (★) neoformação óssea, (❖) Tecido conjuntivo.

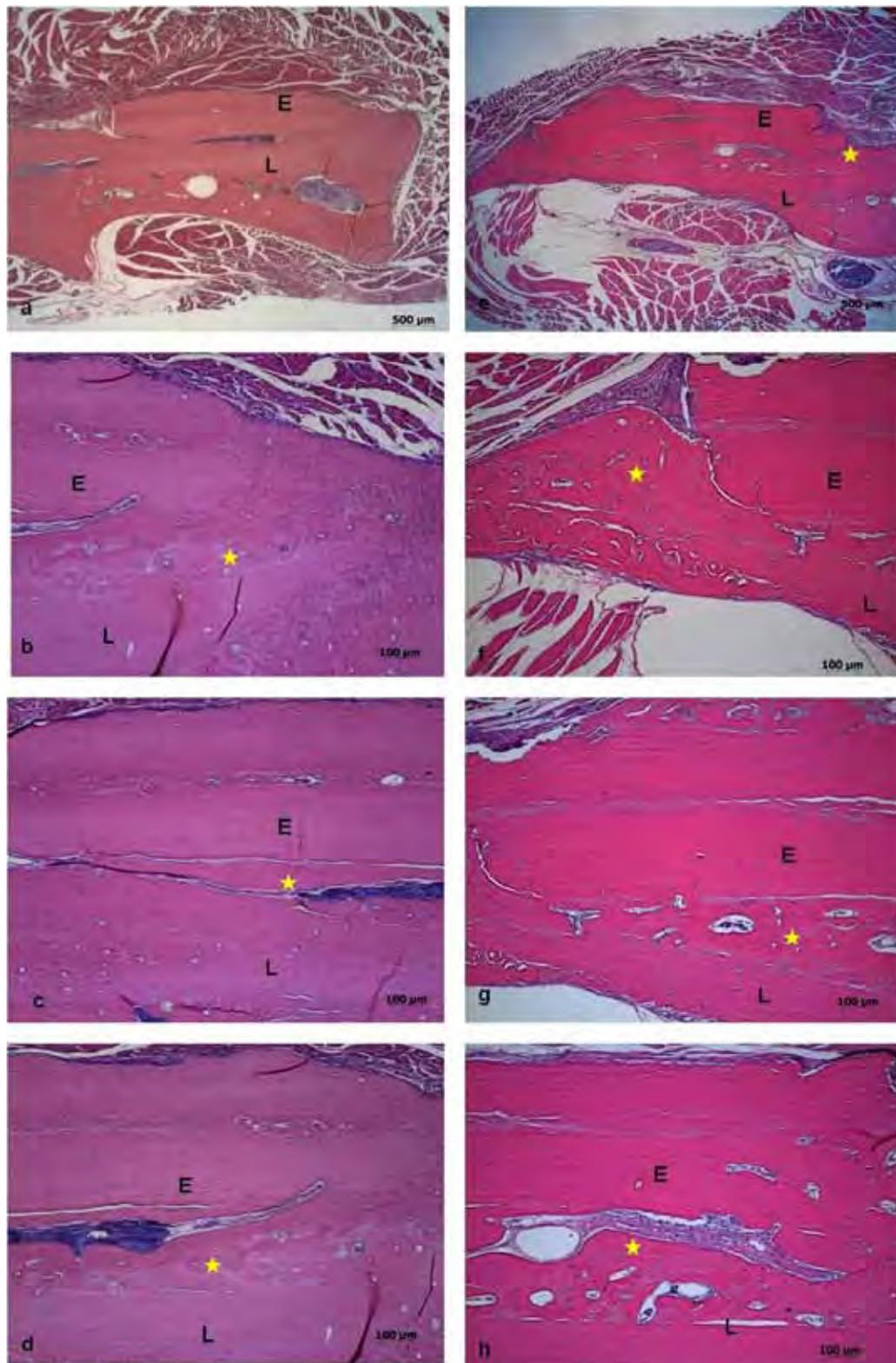


Figura 21 – Dia 45. a, b, c e d) Rato C-E; e, f, g e h) Rato C-ME. (E) Enxerto, (L) Leito receptor, (★) neoformação óssea.

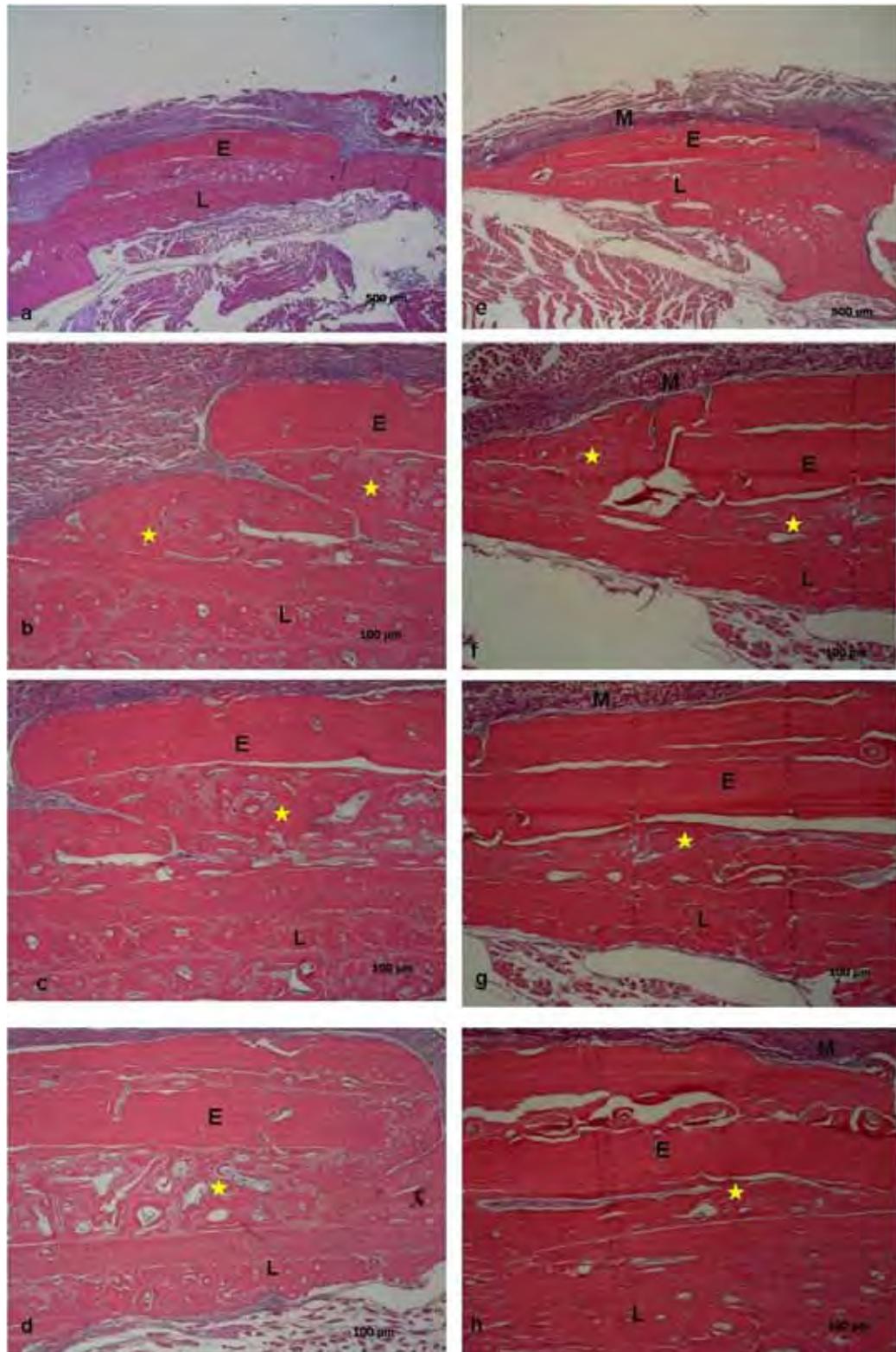


Figura 22 – Dia 45. a, b, c e d) Rato D-E; e, f, g e h) Rato D-ME. (E) Enxerto, (L) Leito receptor, (★) neoformação óssea.

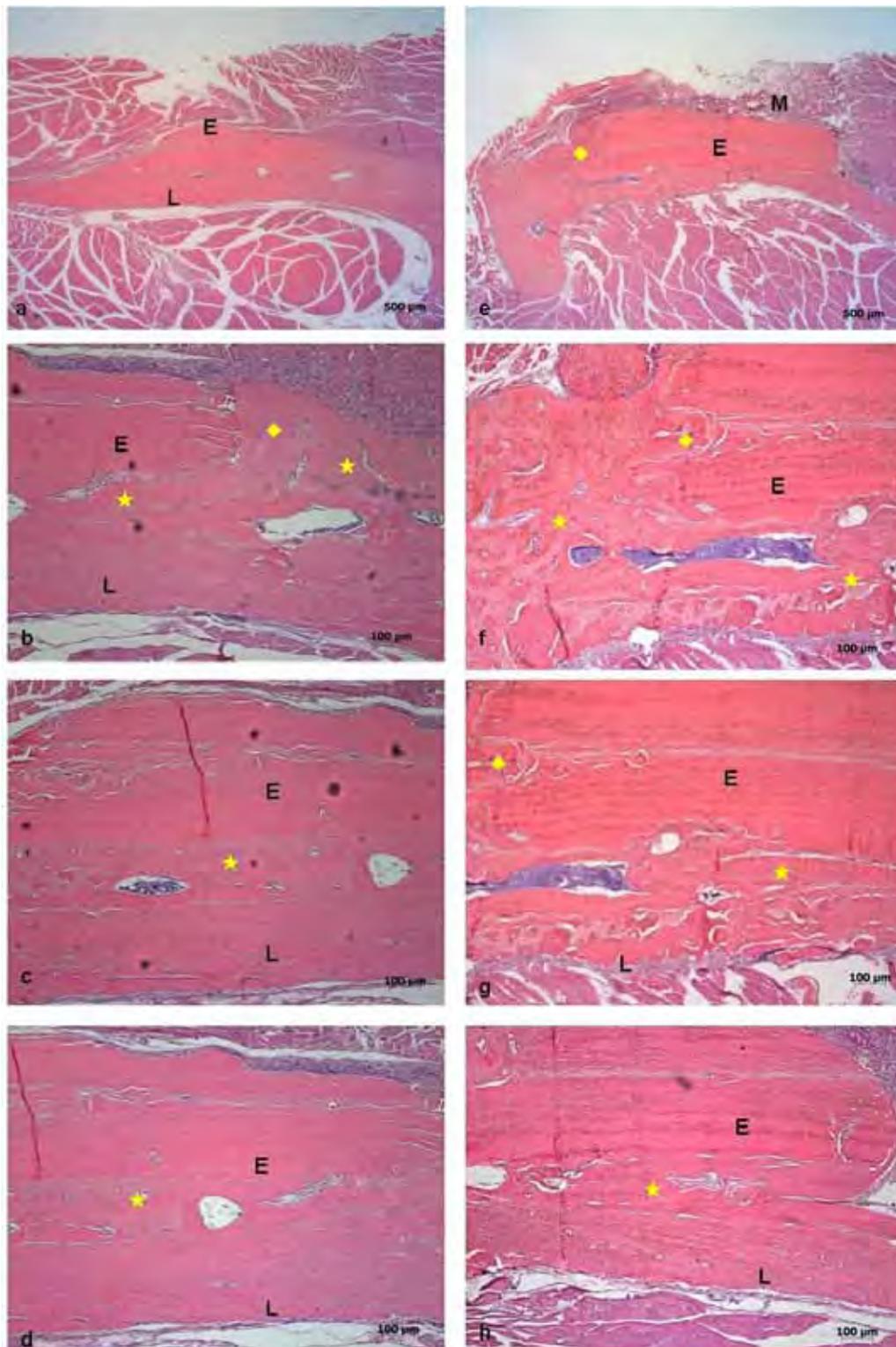


Figura 23 – Dia 60. a, b, c e d) Rato C-E; e, f, g e h) Rato C-ME. (E) Enxerto, (L) Leito receptor, (★) neoformação óssea, (◆) Reabsorção lateral do enxerto e neoformação óssea.

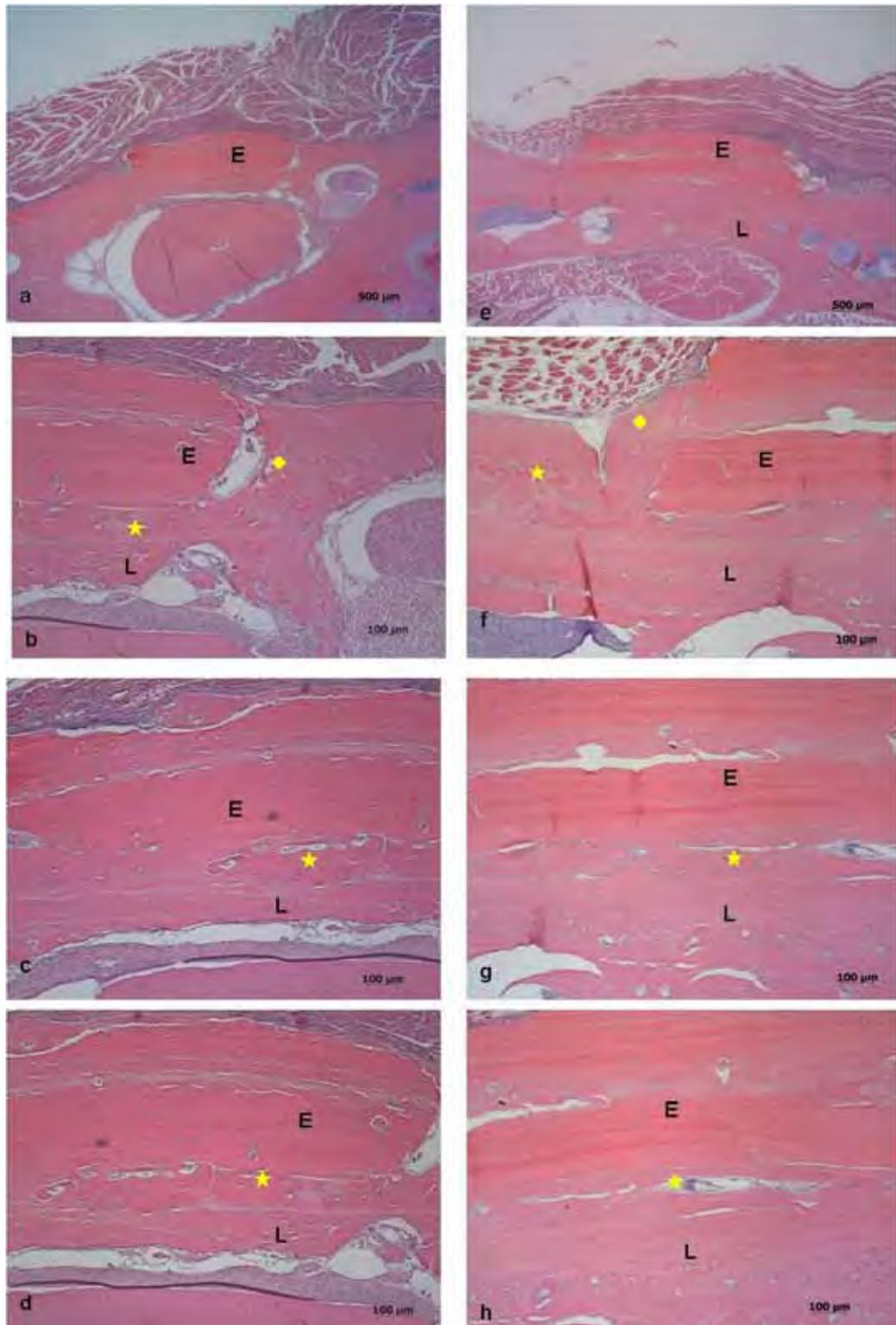


Figura 24 – Dia 60. a, b, c e d) Rato D-E; e, f, g e h) Rato D-ME. (E) Enxerto, (L) Leito receptor, (★) neoformação óssea, (◆) Reabsorção lateral do enxerto e neoformação óssea.

5.2 Análise Histomorfométrica

Para avaliar o relacionamento entre as variáveis experimentais: a condição dos animais: Diabético (D) ou Controle (C); o tratamento realizado: a membrana de colágeno quanto à sua ausência (E) ou presença (ME) no recobrimento do enxerto, e os períodos de eutanásia (zero, sete, 14, 21, 45 e 60 dias). Os dados obtidos neste estudo, foram submetidos ao modelo estatístico da análise de variância

Os valores médios das condições experimentais Condição x Tratamento x Tempo são comparados entre si, por meio do teste de Tukey (5%).

5.2.1 Altura do enxerto

A estatística descritiva (média±desvio padrão) dos dados obtidos da altura do enxerto é apresentado por meio da Tabela 1 e mostrada a seguir.

Tabela 1 - Média e desvio padrão da altura do enxerto (μm)

		<i>(Continua)</i>					
TEMPO		T0		T7		T14	
TRATAMENTO		E	ME	E	ME	E	ME
CONDIÇÃO	CONTROLE	616.3 ± 667.8	529.6 ± 36.2	563.2 ± 27.2	556.1 ± 29.4	544.7 \pm 53.5	542.8 ± 39.4
	DIABETES	515.8 ± 69.7	529.6 ± 36.2	462 ± 42	478.8 ± 53.8	476.4 \pm 62.6	463.7 ± 67.2
		<i>(Conclusão)</i>					
TEMPO		T21		T45		T60	
TRATAMENTO		E	ME	E	ME	E	ME
CONDIÇÃO	CONTROLE	543.4 ± 100.8	567.6 ± 60.8	513.7 ± 42.3	515.7 ± 38	489.2 ± 42.1	542.4 ± 27.5
	DIABETES	445 ± 21.69	440.1 ± 48.3	478.4 ± 87.4	512.4 ± 80.6	486.89 ± 19.47	480.4 ± 55.5

O resultado do teste ANOVA (dois fatores) das condições experimentais Tempo, condição e Tempo tratamento, para a altura do enxerto, e os valores médios comparados entre si, por meio do teste de Tukey (5%). são apresentados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Teste ANOVA. Tempo x Condição para altura do enxerto.

TEMPO	T0	T7	T14	T21	T45	T60
CONTROLE	572.95 A	559.69 AB	543.78 ABC	555.45 AB	514.71 ABCD	515.77 ABCD
DIABETES	522.71 ABCD	470.36 CD	470.04 CD	442.54 D	595.40 ABCD	483.66 BCD

p<0,05

Tabela 3 - Teste ANOVA. Tempo x Tratamento para a altura do enxerto.

TEMPO		T0	T7	T14	T21	T45	T60
TRATAMENTO	E	566.05	512.59	510.58	494.18	496.03	488.04
		A	A	A	A	A	A
	ME	529.61	517.46	503.24	503.82	514.08	511.40
		A	A	A	A	A	A

p<0,05

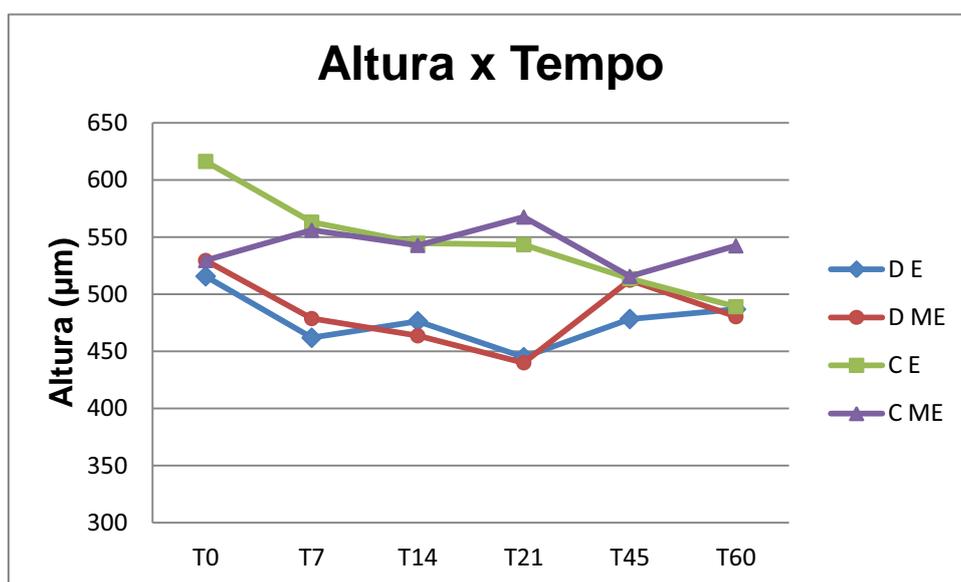


Figura 25 – Gráfico dos valores médios das condições experimentais Condição x Tratamento x Tempo comparados entre si. D-E (Diabético-enxerto); D-ME (Diabético-membrana-enxerto); C-E (Controle-Enxerto); C-ME (Controle-membrana-enxerto).

Analisando a tabela 2 e a figura 24, as variáveis tempo e condição, observa-se tanto no grupo controle (C) quanto diabetes (D), que ocorre diminuição da altura do bloco com o decorrer do tempo, porém essa diminuição não foi estatisticamente significativa intra grupo. Comparando os grupos diabéticos (D) e controle (C) entre si, ocorreu diferença estatisticamente significativa nos dias 7 e 21.

Analisando a tabela 3 e a figura 25, as variáveis tempo e tratamento, observa-se que nas duas formas de tratamento (E), (ME), houve redução da altura do enxerto, redução maior nos grupos sem a membrana (E). No entanto, para essa redução da altura do bloco, não observa-se diferença estatisticamente significativa intra e inter grupo (E), (ME). Podendo-se verificar, por meio do teste ANOVA, nem a condição nem o tratamento influenciaram estatisticamente na altura dos blocos.

5.2.2 Neoformação

A estatística descritiva (média \pm desvio padrão) dos dados obtidos da neoformação óssea são apresentados por meio da Tabela 4 e mostrada a seguir

Tabela 4 - Média e desvio padrão da neoformação

		<i>(Continua)</i>					
TEMPO		T0		T7		T14	
TRATAMENTO		E	ME	E	ME	E	ME
CONDIÇÃO	CONTROLE	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	2.02 ±1.06	2.32 ±1.64
	DIABETES	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	2.49 ±0.82	3.68 ±2.29

		<i>(Conclusão)</i>					
TEMPO		T21		T45		T60	
TRATAMENTO		E	ME	E	ME	E	ME
CONDIÇÃO	CONTROLE	3.02 ±2.21	5.46.6 ±1.48	1.98 ±3.01	8.64 ±2.10	7.66 ±6.03	9.22 ±3.04
	DIABETES	2.22 ±2.75	1.70 ±2.11	2.44 ±3.19	7.56 ±2.56	4.76 ±6.57	7.42 ±4.44

O resultado do teste ANOVA (2 fatores) das condições experimentais, Tempo condição e Tempo tratamento, para a neoformação óssea, e os valores médios comparados entre si, por meio do teste de Tukey (5%). são apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Teste ANOVA. Tempo x Condição para neoformação óssea

TEMPO	T0	T7	T14	T21	T45	T60
CONTROLE	0.0	0.0	2.17	4.24	5.31	8.44
	D	D	BCD	BC	ABC	A
DIABETES	0.0	0.0	3.08	1.96	5.00	6.09
	D	D	BCD	CD	ABC	AB

p<0,05

Tabela 6 - Teste ANOVA. Tempo x Tratamento para neoformação óssea.

TEMPO		T0	T7	T14	T21	T45	T60
TRATAMENTO	E	0.0	0.0	2.55	2.62	2.21	6.21
		C	C	BC	BC	C	AB
	ME	0.0	0.0	3.00	3.58	8.10	8.32
		C	C	BC	BC	A	A

p<0,05

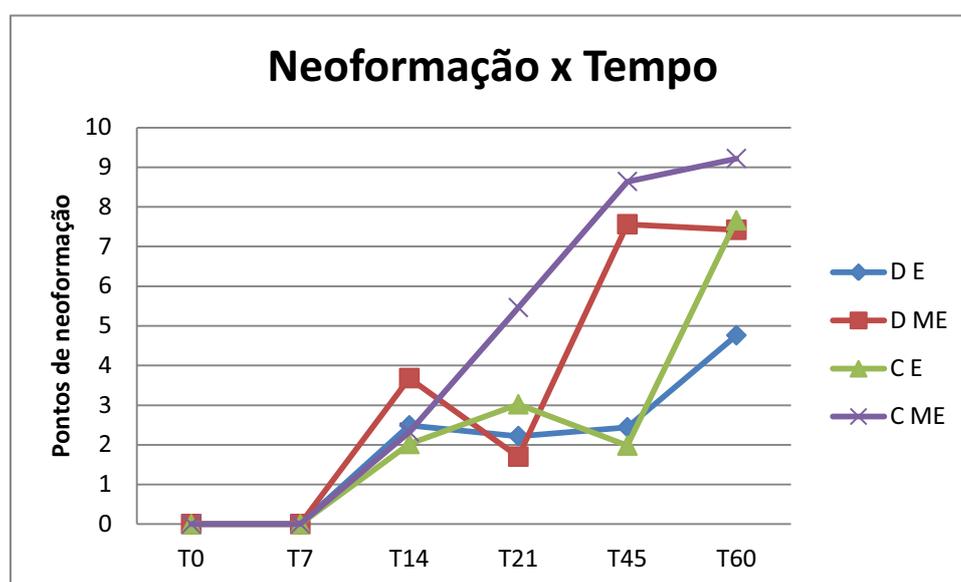


Figura 26 – Gráfico dos valores médios das condições experimentais Condição x Tratamento x Tempo comparados entre si. D-E (Diabético-enxerto); D-ME (Diabético-membrana-enxerto); C-E (Controle-Enxerto); C-ME (Controle-membrana-enxerto).

Analisando a tabela 5 e a figura 26, as variáveis tempo e condição, observa-se tanto no grupo controle (C) quanto diabetes (D), ocorre neoformação óssea na periferia do enxerto de acordo com os tempos analisados, aumento maior nos ratos do grupo controle (C), sendo estatisticamente significativo à partir do tempo 21.

No grupo controle (C), apresentou diferença estatística nos seguintes períodos: T60 $p < 0,05$ que T0, T7, T14 e T21. T45 $p < 0,05$ que T0, T7. T21 $p < 0,05$ que T0, T7. No Grupo diabetes (D), apresentou diferença estatística nos seguintes períodos: T60 $p < 0,05$ que T0, T7, e T21. T45 $p < 0,05$ que T0, T7.

Na comparação entre condições, diabetes (D), controle (C), não se observou diferença estatística entre os mesmos períodos.

Analisando a tabela 6 e a figura 26, as variáveis tempo e tratamento, nas duas situações ocorre neoformação óssea na periferia do enxerto, crescimento mais acentuado no grupo tratado com a membrana (ME). Para o grupo sem a membrana (E), houve aumento estatisticamente significativo em T60 $p < 0,05$ que T0, T7 e T45. Para o grupo tratado com a membrana (ME), houve aumento estatisticamente significativo em T60 e T45 $p < 0,05$ T0, T7, T14 e T21.

Na comparação entre os tratamentos realizado (ME x E) nos diferentes períodos, ocorreu diferença estatisticamente significativa apenas no período T45.

A partir desses dados pode se dizer que a diabetes não influenciou de maneira negativa a neoformação óssea ao redor dos enxertos. A membrana teve seu maior efeito sobre a neoformação óssea aos 45 dias.

5.2.3 Integração leito receptor e enxerto.

A estatística descritiva (média \pm desvio padrão) dos dados obtidos da integração do enxerto ao leito receptor são apresentados por meio da Tabela 7 e mostrada a seguir.

Tabela 7 - Média e desvio padrão da integração leito receptor e enxerto

(Continua)

TEMPO		T0		T7		T14	
TRATAMENTO		E	ME	E	ME	E	ME
CONDIÇÃO	CONTROLE	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	24.4 ±33.5	169 ±379
	DIABETES	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	212 ±312	602 ±620

(Conclusão)

TEMPO		T21		T45		T60	
TRATAMENTO		E	ME	E	ME	E	ME
CONDIÇÃO	CONTROLE	129 ±209.5	557.6 ±614	1007 ±1021	1944 ±516	1740 ±1000	2627 ±226
	DIABETES	287 ±393	561 ±610	1128 ±1016	2380 ±417	1221 ±1349	1704 ±395

O resultado do teste ANOVA (dois fatores) das condições experimentais Tempo condição e Tempo tratamento, para a integração do enxerto ao leito receptor, e os valores médios comparados entre si, por meio do teste de Tukey (5%) são apresentados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Teste ANOVA. Tempo x Condição integração leito receptor e enxerto

TEMPO		T0	T7	T14	T21	T45	T60
CONDIÇÃO	CONTROLE	0.0	0.0	96.90	342.83	1475.3	2183.7
		B	B	B	B	A	A
CONDIÇÃO	DIABETES	0.0	0.0	407.10	424.17	1753.9	1462.8
		B	B	B	B	A	A

p<0,05.

Tabela 9 - Teste ANOVA. Tempo x Tratamento para integração leito receptor enxerto

TEMPO		T0	T7	T14	T21	T45	T60
TRATAMENTO	E	0.0	0.0	118.07	208	1067.2	1480.8
		D	D	D	D	BC	AB
TRATAMENTO	ME	0.0	0.0	385.93	559	2162.1	2165.7
		D	D	CD	CD	A	A

p<0,05.

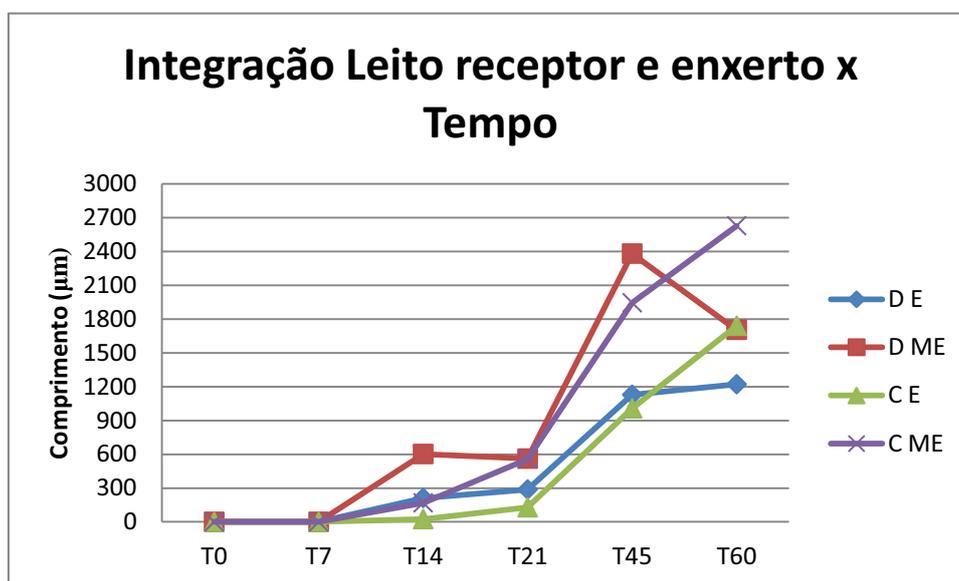


Figura 27 – Gráfico dos valores médios das condições experimentais Condição x Tratamento x Tempo comparados entre si D-E (Diabético-enxerto); D-ME (Diabético-membrana-enxerto); C-E (Controle-Enxerto); C-ME (Controle-membrana-enxerto).

Analisando a tabela 8 e a figura 27, as variáveis tempo e condição, observa-se tanto no grupo controle (C) quanto diabetes (D), que ocorreu aumento da integração do enxerto ao leito com o decorrer do tempo, sendo nas duas condições, diferença estatisticamente significativa a partir do dia 21, sendo os períodos T60 e T45 não apresentando estatística significativa entre si. T60 e T45 $p < 0,05$ que T21, T14, T7, T0. Comparando os períodos entre si, não existiu estatística significativa em nenhum período.

Analisando a Tabela 9 e a figura 27, os fatores tempo e tratamento, observa-se para os dois tratamentos T60 e T45 $p < 0,05$ que T21, T14, T7, T0. Comparando os períodos entre si, apenas no tempo 45, ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com e sem membrana T45(E) $p < 0,05$ que T45(ME). Podendo se dizer que a membrana teve influencia sobre a integração do enxerto ao leito receptor apenas aos 45 dias.

6 DISCUSSÃO

Considerando a importância da Diabetes Mellitus (DM) na saúde pública e o aumento da expectativa de vida da população, bem como a procura por procedimentos reabilitadores, o presente estudo buscou avaliar a influência da DM no reparo de enxertos ósseos autógenos associados ou não à membrana colágena reabsorvível em modelo experimental de indução da DM em ratos Wistar.

A odontologia tem acompanhado o aumento da expectativa de vida e conseguido propiciar aos pacientes tratamentos reabilitadores cada vez mais especializados. A realização de enxerto ósseo autógeno tem proporcionado a colocação de implantes osseointegrados em áreas que antes não seriam possíveis (Buser et al., 1995; Buser et al., 1996; Donos et al., 2002; Jardini et al., 2005).

A reconstrução de rebordos atróficos com enxertos ósseos autógenos é tema de diversos estudos realizados em animais (Dado, Izquierdo, 1989; Hardesty et al., 1990; Alberius et al., 1992; Donovan et al., 1993) e humanos (Breine, Brånemark, 1979; Misch, Misch, 1995; Becker et al., 1996; Raghoobar et al., 1996; Williamson et al., 1996; Garg et al., 1998; Pikos, 2000), tendo áreas doadoras intra e extra-buciais.

A escolha do rato como modelo experimental baseou-se no fato de se tratar de um modelo já consagrado em função do baixo custo, facilidade de armazenamento e boa disponibilidade (Kalu et al., 1989), e da facilidade logística.

A utilização da calvária como área doadora e a mandíbula como área receptora baseou-se na mesma origem embrionária e a menor reabsorção observada nestes enxertos de acordo com outros estudos realizados (Dado, Izquierdo, 1989; Donovan et al., 1993; Donos et al., 2002).

A escolha pelo enxerto em bloco autógeno em bloco, foi escolhida por ser considerada *gold standad* das técnicas de ganho de tecido ósseo e por ser imunologicamente inerte e osteogênico (De Marco et al. 2005; Jardini et al., 2005; Nascimento et al., 2009; Tera, 2010).

Concomitantemente aos estudos com enxertos ósseos autógenos em bloco, e a regeneração óssea guiada (ROG), optou-se pela membrana colágena por esta ser reabsorvível sem a necessidade de segunda cirurgia para remoção, bem como as características de biocompatibilidade, capacidade de seleção de células osteogênicas, ao mesmo tempo que impede a invasão de tecido conjuntivo adjacente, favorecendo a neoformação óssea. Estudos clínicos e em modelo animal têm mostrado resultados superiores quando esta é utilizada, e também quando comparada à barreira de PTFE-e (Taguchi et al., 2005).

Alpar et al. (2000) avaliaram a biocompatibilidade de barreira de PTFE-e, membrana reabsorvível (Bio-Gide®, Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland) em cultura de células de fibroblastos e osteoblastos do ligamento periodontal.. A membrana reabsorvível (Bio-Gide®, Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland) mostrou se biocompatível, citocompatível e apresentou boa integração ao tecido conjuntivo. Por outro lado, a barreira de PTFE-e induziu reações citotóxicas leves a moderadas que reduziram a adesão celular. Além da formação de fendas entre a barreira e o tecido conjuntivo que podem facilitar a invasão epitelial e o acúmulo bacteriano.

As alterações ósseas encontradas nos ratos após a indução do DM são denominadas osteopenia ao invés de osteoporose,

uma vez que estes animais, ao contrário do humano, não sofrem fraturas por traumas de baixo impacto. Essas alterações ósseas ocorrem devido à perda de cálcio devido a poliúria, a alterações na síntese de colágeno, devido a formação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) (Claudino et al., 2007), a atuação da hiperglicemia na função dos osteoblastos e osteoclastos.

Em nosso modelo experimental de indução de DM pela aloxana, observou-se que os ratos apresentaram aumento da glicemia superior a 200 mg/dL e perda de peso comparado aos ratos do grupo controle, apesar dos resultados não apresentarem diferença estatisticamente significativa. No estudo realizado por Diniz et al. (2008) mostraram, em modelo experimental semelhante, que os níveis de glicemia foram significativamente maiores para os ratos diabéticos, enquanto não houve diferença no peso dos animais diabéticos e controle.

Giglio e Lama (2001) estudaram os efeitos da DM experimental no crescimento mandibular de ratos. Os ratos foram induzidos à DM com 26 dias de vida, e sacrificados 31 dias após a indução. Os animais diabéticos apresentaram diminuição do peso corporal, aumento da ingestão alimentar, aumento da glicemia, redução significativa do crescimento da mandíbula (símfise, processo coronóide, processo alveolar, côndilo, ângulo e base). Os autores avaliaram que a DM induzida reduz o crescimento mandibular, resultando em deformidade de sua estrutura.

Diniz et al. (2008) estudaram o efeito da diabetes induzida por aloxana no reparo de fraturas ósseas em tibia de ratos, após 7, 14, 25 e 35 dias. Aos 7 dias, os ratos induzidos a diabetes apresentaram quantidade significativamente menor de cartilagem e quantidade significativamente maior de tecido conjuntivo quando comparado ao grupo controle, enquanto o grupo controle mostrou áreas de neoformação óssea. Nos demais períodos, os ratos diabéticos mostraram significante

formação de calo ósseo, condrogênese comparados ao grupo controle. Aos 25 dias, o grupo controle mostrou maior quantidade de osso medular que os diabéticos. No período final, observou-se reconstrução mais rápida das corticais no grupo controle. Segundo os autores, os resultados sugerem que a formação excessiva de tecido conjuntivo no período inicial não é capaz de promover estabilidade necessária para os ossos fraturados, atrapalhando seu alinhamento e aumentando o volume do calo ósseo nos estágios mais tardios do reparo ósseo, avaliando a diabetes atrasa o reparo ósseo.

De Amorim et al. (2008) realizaram fatura na tíbia de ratos induzido a diabetes e observaram atraso no reparo, que apresentaram, tanto aos 7 e 14 dias, maior quantidade de tecido conjuntivo e menor quantidade de neoformação óssea quando comparado ao grupo controle. A análise imunohistoquímica revelou aumento da atividade reabsortiva nos ratos diabéticos, especialmente no 14º dia.

Akyol e Gungormus (2010) realizaram defeitos ósseos no fêmur de ratos diabéticos e observaram diferenças estatisticamente significantes quanto ao reparo ósseo entre ratos diabéticos e ratos controle. Os ratos controle mostraram, após 10 dias, maior neoformação óssea que os ratos diabéticos, e aos 20 dias, o tecido ósseo neoformado nos ratos controle, ocupava mais da metade do defeito, enquanto o grupo diabético apresentava grande quantidade de tecido conjuntivo.

Erdal et al. (2012) investigaram os efeitos da terapia com insulina nas propriedades bioquímicas do fêmur de ratos com 12 semanas induzido a diabetes. Os ratos foram divididos em 4 grupos: Controle, Sham, Diabéticos e Diabéticos tratados com insulina diária. Após 8 semanas da indução foi realizada a eutanásia dos ratos. O peso e os níveis de glicose foram significativamente maiores para os ratos diabéticos, tratados e os não tratados, quando comparados aos outros 2 grupos. Houve redução significativa do comprimento do fêmur e para os

parâmetros biomecânicos nos grupos diabéticos com e sem insulina, quando comparados aos grupos controle. E diferença estatisticamente significativa na comparação entre o grupo diabético com e sem tratamento. Segundo os autores, a diabetes pode causar enfraquecimento ósseo e o tratamento com insulina pode proteger a integridade mineral, prevenindo sua perda. Entretanto, o tratamento com insulina não foi eficaz na restauração da deterioração dos padrões biomecânicos.

Em nosso estudo, na análise histológica descritiva e na análise histomorfométrica foi observado nos dias zero e sete que não ocorreu reabsorção do enxerto, não ocorreu neoformação óssea na periferia do enxerto e nem integração do enxerto ao leito receptor, nas condições e tratamentos avaliados.

Na análise da altura do enxerto, foi observado que independente da condição do rato e do tratamento realizado, ocorre uma diminuição da altura do bloco, sendo essa diminuição maior nos ratos diabéticos e nos grupos não tratados com a membrana. Porém na análise estatística, nem a condição sistêmica, nem o tratamento com a membrana interferiram na altura do enxerto.

Essa análise corrobora com Abbassy et al. (2010) que avaliaram os efeitos da DM sobre a mandíbula e as alterações na formação alveolar de ratos induzidos a diabetes com 3 semanas de idade. Através de análise clínica, histomorfométrica, histológica e por microtomografia, realizados 3 e 4 semanas após indução da diabetes, houve diminuição significativa do peso dos ratos diabéticos a partir do dia 14, quando comparado aos ratos controle. A análise histomorfométrica mostrou diminuição significativa da aposição e da formação mineral em ratos diabéticos, quando comparado ao grupo controle. A microtomografia revelou significativa deterioração da qualidade óssea nos ratos diabéticos. A análise histológica mostrou que o número de osteoclastos foi significativamente menor nos ratos diabéticos, o que sugere que a DM não

controlada diminui a formação óssea mandibular, diminui o metabolismo ósseo no alvéolo dentário e afeta a qualidade da estrutura óssea, resultando no atraso do desenvolvimento do esqueleto. Os autores observaram ainda aumento dos espaços medulares, indicando um profundo impacto na integridade do osso. Nesse contexto, esses resultados foram descritos como osteopenia, que por sua vez, resulta da falta de equilíbrio entre formação e reabsorção óssea.

Nossa análise concorda com Abbassy et al. (2010) em que o rato induzido a diabetes inicia o processo de osteopenia em curto prazo após a administração da droga. Porém são necessários estudos imunohistoquímicos para averiguar, se o processo ocorre pela reabsorção do enxerto devido a maior atividade osteoclástica, ou pela menor formação óssea e menor atividade osteoblástica, já que os ratos do estudo foram induzidos a DM experimental aos 60 dias de vida e em período de crescimento.

Para a análise da neoformação óssea na periferia do enxerto, observou-se que a partir do dia 14 ocorre a formação de trabéculas ósseas imaturas apresentando osteócitos volumosos e superfície recoberta por numerosos osteoblastos, sobre tecido conjuntivo, nas duas condições e nos dois tratamentos. Com o decorrer dos períodos, ocorre aumento da neoformação óssea, o osso neoformado nos ratos diabéticos mostrou-se mais trabecular que o apresentado pelos ratos do grupo controle, no decorrer dos períodos o osso neoformado nos grupo controle, apresentava osteócitos menores, enquanto o osso neoformado nos ratos diabético apresentavam maior quantidades de espaços medulares.

Concordando com nossos resultados, Esteves et al. (2008) avaliaram reparo ósseo de defeitos criados na tíbia de ratos induzidos ao diabetes e preenchidos por osso autógeno ou por coágulo sanguíneo. Aos 30 dias observaram completo reparo ósseo nos 2 grupos

controle e induzidos ao diabetes, e nas duas formas de tratamento. A neoformação óssea foi melhor quando o defeito foi preenchido por osso autógeno, e foi quantitativamente semelhante entre os grupos controle e diabético e qualitativamente melhor no grupo controle. Nos ratos diabéticos foi observado maior presença de espaços trabeculares que também apresentaram maior número de vasos sanguíneos e discreto aumento do infiltrado inflamatório.

Neste estudo os animais tratados com membrana, Diabete-membrana-enxerto (D-ME) e Controle-membrana-enxerto(C-ME) apresentaram maior neoformação que os ratos não tratados com a membrana, Diabete enxerto (D-E), Controle enxerto (C-E), sendo maior a neoformação nos ratos C-ME, semelhante neoformação nos ratos D-ME e C-E e menor neoformação nos ratos nos ratos D-E

Observou-se ainda que ocorreu reabsorção nas bordas laterais do enxerto e preenchimento por osso neoformado, sendo que nos grupos em que a membrana foi utilizada C-ME, D-ME, essa delimitação por vezes foi de difícil visualização nos períodos finais do estudo.

Houve maior neoformação óssea nos grupos Controle (C) e pelos grupos tratados com a membrana (ME), existindo diferença estatisticamente significativa a partir do período 21, nas duas condições, Diabétes (D) e Controle (C). A condição Diabetes (D) não interferiu negativamente na neoformação. Quanto ao uso da membrana, esta favoreceu a neoformação aos 45 dias, não existindo diferença estatisticamente significativa aos 60 dias.

Analisando a integração do enxerto ao leito receptor, no dia 7 observa-se tecido conjuntivo interposto, e a partir do dia 14 inicia-se formação de trabéculas ósseas imaturas com pequenos pontos de integração.

No período 21 na interface leito-enxerto existem maiores áreas de osseointegração e menor quantidade de tecido conjuntivo

interposto quando comparado aos períodos anteriores, Áreas de integração maior nos grupos recobertos pela membrana (C-ME, D-ME), que nos grupos não tratados (C-E, D-E). A partir desse período verificamos que o enxerto e o leito receptor apresentam maior quantidade de espaços medulares nos ratos diabéticos, (D-ME e D-E), que nos ratos controle (C-ME e C-DE).

No período 45, nos grupos em que os enxertos foram recobertos pela membrana (C-ME, D-ME), estes apresentavam-se integrados ao leito receptor. Dentre os quatro grupos, o que apresentou maior quantidade de tecido interposto foi o grupo dos ratos diabéticos cujo enxerto não foi recoberto pela membrana (D-E). O grupo (D-ME), foi o grupo que apresentou maior integração leito enxerto neste período.

No período final do estudo, os melhores resultados de integração foram nos ratos controle tratado com membrana, (C-ME). Houve diminuição na integração do enxerto ao leito receptor para o ratos diabéticos tratado com membrana (D-ME).

No presente estudo, os ratos do grupo controle apresentaram maior integração do enxerto ao leito, que os ratos induzidos ao diabetes, porém não existiu diferença estatisticamente significativa quanto a condição sistêmica dos animais (D) e (C), nos períodos analisados.

Ogasawara (2008) utilizaram 62 ratos induzidos à diabetes e 64 controle que foram submetidos à fratura do fêmur para análise da formação cartilaginosa e união óssea. Nos períodos 7, 14, 28 e 42 dias, os animais foram radiografados e submetidos a eutanásia. Nos 2 períodos iniciais, o calo cartilaginoso formado foi significativamente menor que o grupo controle. No dia 28, o exame radiográfico mostrou que o calo ósseo dos ratos diabéticos foi menor que dos ratos controle. Aos 42 dias, a taxa de união foi semelhante entre os grupos. Os autores analisaram que a taxa de reparo ósseo dos ratos diabéticos foi significativamente

menor que a dos ratos controle nos 2 períodos iniciais, sendo semelhante nos demais períodos.

Quanto ao tratamento realizado, (E) e (ME), observou-se maior integração do enxerto ao leito receptor com o decorrer do tempo nos dois tratamentos, sendo a integração maior nos ratos tratados com a membrana (ME), porém apenas no dia 45 existiu diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.

Apesar de não serem encontrados dados significativamente diferentes do ponto de vista estatístico entre os grupos Controle e Diabetes, na integração leito receptor enxerto, uma característica marcante foi constante na análise histológica descritiva dos animais submetidos à diabetes Tanto o leito receptor, no enxerto e no osso neoformado entre o leito receptor e o enxerto, mostraram maior quantidade e diâmetro de espaços medulares, sendo inclusive possível, algumas vezes, identificar tecido conjuntivo no interior Estas características denotam a influência da diabetes no desenvolvimento da osteopenia.

Nesse sentido estudos imunohistoquímicos dos processos são úteis no esclarecimento dos eventos envolvidos na osteopenia provocada pelo diabetes. A conjunção destes estudos poderá constituir importante contribuição na previsibilidade no sucesso de tratamento que envolvam ROG, integração de enxertos e osseointegração de implantes instalados nesses pacientes.

No presente estudo, não foi realizada comparações com ratos tratados com insulina, para simular situações críticas da influencia da DM no reparo de enxertos. Segundo a literatura estudada, quando os ratos induzidos a DM, são tratados com insulina, ocorrem resultados de reparo ósseo melhores que em ratos não tratados com a insulina, porém inferiores a ratos não induzidos a DM.

Kwon et al. (2005) estudaram a integração de mini-implantes em ratos induzidos a diabetes. 32 ratos foram submetidos à cirurgia para colocação de mini-implantes no fêmur e após 28 dias, induziu-se diabetes em todos os animais, sendo que metade recebeu tratamento com insulina. Foi analisado o contato osso e mini implante 1, 2, 3 e 4 meses após a indução do diabetes. Os ratos não tratados com insulina apresentaram nos períodos analisados menor contato entre osso e mini implante.

Follak et al. (2003) em seu estudo utilizaram ratos espontaneamente diabéticos tratados com insulina, e após ter sido realizado defeito ósseo, foram divididos em 2 grupos: 60 ratos bem-compensados (glicemia abaixo de 300mg/dl); 60 ratos não-compensados (glicemia acima de 300mg/dl), e grupo controle. A Eutanásia foi realizada nos períodos 7, 14, 24 e 42 dias, resultando em 15 animais por grupo, Foi realizada análise por microscopia eletrônica de varredura e avaliaram que, até o dia 24, o reparo no grupo bem compensado foi significativamente maior que no grupo não compensado. Aos 42 dias, o reparo do defeito ósseo estava completo, e neste momento, não se observou diferenças entre os ratos controle, diabéticos não compensados e diabéticos compensados.

Follak et al. (2004a) realizaram a análise histomorfométrica e biomecânica do mesmo modelo experimental avaliando que o processo de reparo ósseo foi retardado apenas nos ratos não compensados, tendo seu pior resultado nas 2 primeiras semanas, observando diminuição significativa da formação e tempo de mineralização, além de diminuição significativa também das propriedades biomecânicas

Follak et al. (2004b), utilizaram modelo experimental semelhante aos anteriores, realizaram defeitos ósseos de 0,4 mm (não críticos), 0,8 mm e 1,2 mm (críticos) e observaram que, nos defeitos não

críticos, a DM não interferiu no reparo ósseo. Nos defeitos críticos (maiores que 0,8 mm), o atraso do reparo ocorreu apenas nos ratos diabéticos não compensados.

Follak et al. (2005) utilizaram modelo de ratos semelhantes aos trabalhos anteriores, porém avaliaram as propriedades biomecânicas do fêmur após fratura, realizando a eutanásia após 2, 4 e 6 semanas. Após 4 semanas, houve severos distúrbios de mineralização e acentuada diminuição das propriedades biomecânicas do grupo diabético não compensado, quando comparado ao grupo diabético tratado com insulina.

Uma das hipóteses testadas neste trabalho foi confirmar os resultados da regeneração óssea guiada obtidos por Jardini et al. (2005), Nascimento et al. (2009) e Tera (2010) e aplicar o modelo experimental proposto por tais autores em animais com DM induzida.

Os resultados obtidos mostraram que a associação do princípio da ROG ao enxerto ósseo autógeno em bloco proporcionou melhores resultados do que a utilização isolada do enxerto em ambos os grupos experimentais Diabetes (D) e Controle (C).

O grupo Controle tratado com membrana (C-ME), apresentou menor perda da espessura do enxerto, maior neoformação óssea na lateral do enxerto e maior integração do enxerto ao leito receptor.

O mesmo pode ser observado pelo ratos diabéticos tratados com a membrana (D-ME), que apresentaram melhores resultados que os ratos controle e diabéticos sem o tratamento com membrana, (C-E, D-E)

Essa análise corrobora com outros estudos que mostraram melhores resultados da integração ao leito receptor e manutenção do volume dos enxertos ósseos colocados mandíbula de

ratos (Donos et al., 2002; Jardini et al., 2005; Tera, 2010), quando existe a associação com a técnica de ROG.

A explicação para estes dados pode ser dada pelo princípio da ROG, que se baseia na utilização uma membrana inerte semi-permeável que permita a difusão de fluídos e nutrientes ao mesmo tempo em que impede a migração de células provenientes do tecido conjuntivo sem potencial osteogênico, propiciando um ambiente favorável à proliferação de células osteogênicas (Gordh et al., 1998).

Gielkens et al. (2008) avaliaram o reparo de defeitos cirúrgicos críticos (+ 5 mm) em mandíbula de ratos, recobertos por membrana colágena reabsorvível (Bio-Gide®, Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland) e barreira de PTFE-e. Observaram que quando a membrana colágena foi utilizada, houve maior formação de osso, quando comparada ao PTFE-e, embora essa diferença não tenha sido significativa.

Hammerle et al. (2001) instalaram implantes osseointegráveis e cobriram as deiscências com osso liofilizado e membrana colágena reabsorvível (Bio-Gide®, Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland), mostrou que essa técnica utilizando a membrana reabsorvível leva à grande sucesso no reparo ósseo em regeneração óssea guiada.

Von Arx e Buser (2006) realizaram estudo clínico com 42 pacientes, realizaram cirurgia de enxerto ósseo autógeno em pacientes com severa perda óssea horizontal, com recobrimento membrana colágena reabsorvível (Bio-Gide®, Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland), avaliaram que a técnica de RGO foi eficaz.

Hammerle et al. (2008), em estudo clínico, realizaram cirurgia para ganho de volume ósseo em rebordo edêntulo, com preenchimento do defeito ósseo com osso liofilizado e recobrimento membrana colágena reabsorvível (Bio-Gide®, Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland), avaliaram que após um período de cicatrização de 9-10

meses, a combinação é uma opção de tratamento para aumento de volume ósseo previamente à colocação de implantes.

No que tange à previsibilidade dos resultados, em nosso estudo a associação da ROG ao enxerto autógeno em bloco mostrou bons resultados. Tanto o grupo Controle sem a membrana (C-E), quanto no diabetes sem membrana (D-E), mostraram menor espessura do enxerto, menor neoformação óssea na lateral do enxerto e menor integração do enxerto a leito receptor aos 60 dias da do estudo.

Para melhor previsibilidade algumas precauções fundamentais devem ser tomadas com a técnica da ROG. A membrana não deve ficar exposta ao meio externo, deve estar imóvel e a sua extensão ultrapassar as margens do enxerto e para que não ocorra a migração de células sem potencial osteogênico provenientes dos tecidos moles.

Apesar das limitações dos resultados obtidos no estudo em ratos induzidos a DM, a associação da ROG aos enxertos ósseos autógenos em bloco é uma técnica que apresenta boa previsibilidade, sendo necessário outros estudos em modelo animal, para extrapolar para estudos clínicos.

7 CONCLUSÃO

A presença da DM induzida não interferiu de maneira negativa no reparo dos enxerto ósseos autógenos em bloco.

A presença da membrana colágena favoreceu a integração do enxerto ao leito receptor, bem como neoformação óssea ao redor do enxerto.

5 REFERÊNCIAS*

Abbassy MA, Watari I, Soma K. Effect of experimental diabetes on craniofacial growth in rats. *Arch Oral Biol* 2008;53(9):819–25.

Abbassy MA, Watari I, Soma K. The effect of diabetes mellitus on rat mandibular bone formation and microarchitecture. *Eur J Oral Sci*. 2010 Aug;118(4):364-9.

Adeyemo WL, Reuther T, Bloch W, Korkmaz Y, Fisher JH, Zöller JE et al. Healing of onlay mandibular bone grafts covered with collagen membrane or bovine bone substitutes: a microscopical and immunohistochemical study in the sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008;37(7):651-59.

Akyol UK, Güngörmüş M. Effect of biostimulation on healing of bone defects in diabetic rats. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(3):411-6.

Alberius P, Dahlin C, Linde A. Role of osteopromotion in experimental bone grafting to the skull: a study in rats using a membrane technique. *J Oral Maxillofac Surg*. 1992;50(8):829-34.

Alpar B, Leyhausen G, Günay H, Geurtsen W. Compatibility of resorbable and nonresorbable guided tissue regeneration membranes in cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Investig*. 2000;4(4):219-25.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2007;30 Suppl (1):S42-7.

Becker W, Urist M, Becker BE, Jackson W, Parry DA, Bartold M et al. Clinical and histologic observations of sites implanted with intraoral autologous bone grafts or allografts. 15 human case reports. *J Periodontol* 1996;67(10):1025-33.

Breine U, Brånemark PI. Reconstruction of alveolar jaw bone. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1980;14(1):23-48.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414(6865):813–20

Burkhardt R, Moser W, Bartl R, Mahl G. Is diabetic osteoporosis due to microangiopathy? *Lancet*. 1981;11:1(8224):844.

Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodont Rest Dent*. 1993;13(1):29–45.

Buser D, Dula K, Belser U, Peter H, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical procedure in the mandible. *Int J Periodont Rest Dent*. 1995;15(1):10-29.

Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996;54(4):420-32.

Capoglu I, Ozkan A, Ozkan B, Umudum Z. Bone turnover markers in patients with type 2 diabetes and their correlation with glycosylated haemoglobin levels. *J Int Med Res*. 2008 Nov-Dec;36(6):1392-8.

Claudino M, Cleolin DS, Alberti S, Cestari TM, Spadella CT et al. Alloxan-Induced Diabetes trigger the development of periodontal disease in rat. PLoS ONE. 2007; 2(12):e1320. Doi:10.1371/journal.pone.0001320.

Craig R, Rowe D, Kream B: Regulation of bone collagen synthesis and procollagen mRNA levels by insulin. *Calcif Tiss Int.* 1984;36:557–61.

Dado DV, Izquierdo R. Absorption of onlay bone grafts in immature rabbits: membranous versus enchondral bone and bone struts versus paste. *Ann Plast Surg.* 1989; 23(1):39-48.

de Amorim FP, Ornelas SS, Diniz SF, Batista AC, da Silva TA. Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetic rats. *J Mol Histol.* 2008;39(4):401-8.

De Marco AC, Jardini MA, Lima LP. Revascularization of autogenous block grafts with or without an e-PTFE membrane. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20(6):867-74.

Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.* 1995;146(1):56-66.

Devlin H, Garland H, Sloan P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996 Sep;54(9):1087-91.

Diniz SF, Amorim FP, Cavalcante-Neto FF, Bocca AL, Batista AC, Simm GE et al. Alloxan-induced diabetes delays repair in a rat model of closed tibial fracture. *Braz J Med Biol Res.* 2008;41(5):373-9.

Donos N, Kostopoulos L, Karring T. Alveolar ridge augmentation by combining autogenous mandibular bone grafts and non-resorbable membranes. An experimental study in the rat. *Clin Oral Impl Res.* 2002;13(12):185–91

Donovan MG, Dickerson NC, Hellstein JW, Hanson LJ.. Autologous calvarial and iliac onlay bone grafts in miniature swine. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993;51(8):898-903.

Duarte VM, Ramos AM, Rezende LA, Macedo UB, Brandao-Neto J, Almeida MG, et al. Osteopenia: a bone disorder associated with diabetes mellitus. *J Bone Miner Metab* 2005;23(1):58–68.

Erdal N, Gürgül S, Demirel C, Yildiz A. The effect of insulin therapy on biomechanical deterioration of bone in streptozotocin (STZ)-induced type 1 diabetes mellitus in rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012 Apr 6. [Epub ahead of print]

Esteves JC, Aranega AM, Borrascas AG, Fattah CM, Garcia-Júnior IR. Repair process of surgical defects filled with autogenous bone grafts in tibiae of diabetic rats. *J Appl Oral Sci.* 2008 Sep-Oct;16(5):316-20.

Falanga, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet.* 2005;366(9498):1736-43

Follak N, Klötting I, Ganzer D, Merk H. Scanning electron microscopic examinations on retarded bone defect healing in spontaneously diabetic BB/O(ttawa)K(arlzburg) rats. *Histol Histopathol* 2003; 18(1):111–20.

Follak N, Klötting I, Wolf E, Merk H. Histomorphometric evaluation of the influence of the diabetic metabolic state on bone defect healing depending on the defect size in spontaneously diabetic BB/OK rats. *Bone.* 2004a Jul;35(1):144-52.

Follak N, Klötting I, Wolf E, Merk H. Improving metabolic control reverses the histomorphometric and biomechanical abnormalities of an experimentally induced bone defect in spontaneously diabetic rats. *Calcif Tissue Int.* 2004b;74(6):551-60.

Follak N, Klötting I, Merk H. Influence of diabetic metabolic state on fracture healing in spontaneously diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev*. 2005 May-Jun;21(3):288-96.

Fujii H, Hamada Y, Fukagawa M. Bone formation in spontaneously diabetic Torii-newly established model of non-obese type 2 diabetes rats. *Bone*. 2008 Feb;42(2):372-9.

Galkowska H, Wojewodzka U, Olszewski WL. Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen*. 2006;14(5):558-65.

Galluzzi F, Stagi S, Salti R et al. Osteoprotegerin serum levels in children with type 1 diabetes: a potential modulating role in bone status. *Eur J Endocrinol* 2005; 153(6):879–85

Garg AK, Morales MJ, Navarro I, Duarte F. Autogenous mandibular bone grafts in the treatment of the resorbed maxillary anterior alveolar ridge: rationale and approach. *Impl Dent*.1998;7(3):169-74.

Gerdhem P, Isaksson A, Akesson K, Obrant KJ. Increased bone density and decreased bone turnover, but no evident alteration of fracture susceptibility in elderly women with diabetes mellitus. *Osteoporos Int*. 2005;16(12):1506-12.

Gielkens PF, Schortinghuis J, de Jong JR, Raghoobar GM, Stegenga B, Bos RR. Vivosorb, Bio-Gide, and Gore-Tex as barrier membranes in rat mandibular defects: an evaluation by microradiography and micro-CT. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(5):516-21.

Giglio MJ, Lama MA. Effect of experimental diabetes on mandible growth in rats. *Eur J Oral Sci* 2001; 109(3): 193–97.

Glajchen N, Epstein S, Ismail F, Thomas S, Fallon M, Chakrabarti S. Bone mineral metabolism in experimental diabetes mellitus: osteocalcin as a measure of bone remodelling. *Endocrinology* 1988; 123(1):290-95.

Gordh M, Alberius P, Johnell O, Lindberg L, Linde A.. Osteopromotive membranes enhance onlay integration and maintenance in the adult rat skull. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1998;27(1):67-73.

Guarneri MP, Weber G, Gallia P et al. Effect of insulin treatment on osteocalcin levels in diabetic children and adolescents. *J Endocrinol Invest* 1993; 16(7):505–9

Gunczler P, Lanes R, Paoli M, Martinis R, Villaroel O, Weisinger JR. Decreased bone mineral density and bone formation markers shortly after diagnosis of clinical type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001;14(5):525–8

Hamada Y, Kitazawa S, Kitazawa R, Fujii H, Kasuga M, Fukagawa M. Histomorphometric analysis of diabetic osteopenia in streptozotocin-induced diabetic mice: a possible role of oxidative stress. *Bone*. 2007 May;40(5):1408-14

Hamada Y, Fujii H, Fukagawa M. Role of oxidative stress in diabetic bone disorder. *Bone*. 2009 Jul;45 Suppl 1:S35-8.

Hämmerle CH, Lang NP. Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12(1):9-18.

Hämmerle CH, Jung RE, Yaman D, Lang NP. Ridge augmentation by applying bioresorbable membranes and deproteinized bovine bone mineral: a report of twelve consecutive cases. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(1):19-25.

Hardesty RA, Marsh JL. Craniofacial onlay bone grafting: a prospective evaluation of graft morphology, orientation, and embryonic origin. *Plast Reconstr Surg* 1990;85(1):5-14.

Hui SL, Epstein S, Johnston CC. A prospective study of bone mass in patient with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60(1):74-80.

Inaba M, Nishizawa Y, Mita K, Kumeda Y, Emoto M, Kawagishi T, et al. Poor glycemic control impairs the response of biochemical parameters of bone formation and resorption to exogenous 1,25-dihydroxyvitamin D3 in patients with type 2 diabetes. *Osteoporos Int* 1999;9(6):525–31.

Isaia GC, Ardisson P, Di Stefano M, Ferrari D, Martina V, Porta M, et al. Bone metabolism in type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* 1999 Jun;36(1-2):35-8.

Jardini MAN, De Marco AC, Lima LA. Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes: A histomorphometric study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100(6):666-73.

Javed F, Romanos GE. Impact of diabetes mellitus and glycemic control on the osseointegration of dental implants: a systematic literature review. *J Periodontol.* 2009;80(1):1719-30.

Kalu DN. Evaluation of the pathogenesis of skeletal changes in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1984;115(2):507-12.

Kayath MJ, Dib SA, Vieira JG. Prevalence and magnitude of osteopenia associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 1994;8(2):97–104.

Khan SN, Cammisa FP, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg.* 2005;13(1):77–86.

Kim KH, Jeong L, Park HN, Shin SY, Park WH, Lee SC, et al. Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. *J Biotechnol.* 2005;120(3):327-39.

Kwon PT, Rahman SS, Kim DM, Kopman JA, Karimbux NY, Fiorellini JP. Maintenance of osseointegration utilizing insulin therapy in a diabetic rat model. *J Periodontol.* 2005;76(4):621-6.

Lamster IB, Lalla E, Borgnakke WS, Taylor GW. The relationship between oral health and diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc.* 2008 Oct;139 Suppl:19S-24S

Levy JR, Murray E, Manolagas S, Olefsky JM. Demonstration of insulin receptors and modulation of alkaline phosphatase activity by insulin in rat osteoblastic cells. *Endocrinology* 1986;119(4):1786-92.

Loder RT. The influence of diabetes on the healing of closed fractures. *Clin Orthop Relat Res* 1988;(232):210-6

Lopez-Ibarra PJ, Pastor MM, Escobar-Jimenez F, Pardo MD, Gonzalez AG, Luna JD, et al. Bone mineral density at time of clinical diagnosis of adult-onset type 1 diabetes mellitus. *Endocr Pract.* 2001;7(5):346-51.

Lundgren D, Lundgren AK, Sennerby L, Nyman S. Augmentation of intramembranous bone beyond the skeletal envelope using an occlusive titanium barrier. *Clin Oral Implants Res.* 1995;6(2):67-72.

Madden VJ, Henson MM. Rapid decalcification of temporal bones with preservation of ultrastructure. *Hear Res.* 1997;111(1-2):76-84.

Maruyama K, Asai J, Li M, Thorne T, Losordo DW, D'Amore PA. Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing. *Am J Pathol.* 2007(4);170:1178-91.

Matsuzaka K, Shimono M, Inoue T. Characteristics of newly formed bone during guided bone regeneration: observations by immunohistochemistry and confocal laser scanning microscopy. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2001;42(4):225-34.

Misch CM, Misch CE. The repair of localized severe ridge defects for implant placement using mandibular bone grafts. *Impl Dent*. 1995;4(4):261-7.

Nascimento RD, Cardoso PE, De Marco AC, de Lima LA, Jardini MA. Influence of osteopenia in autogenous bone graft healing with or without expanded polytetrafluoroethylene membranes: histologic and histomorphometric study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24(6):1074-82.

Ogasawara A, Nakajima A, Nakajima F, Goto K, Yamazaki M. Molecular basis for affected cartilage formation and bone union in fracture healing of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Bone*. 2008;43(5):832-9.

Ogata N, Chikazu D, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Azuma Y, et al. Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. *J Clin Invest* 2000;105(7):935–43.

Ohnishi T, Bandow K, Kakimoto K, Machigashira M, Matsuyama T, Matsuguchi T. Oxidative stress causes alveolar bone loss in metabolic syndrome model mice with type 2 diabetes. *J Periodontal Res*. 2009 Feb;44(1):43-51.

Pikos MA. Block auto grafts for localized ridge augmentation: part II. The posterior mandible. *Implant Dent* 2000;9(1):67-75.

Pun KK, Lau P, Ho PW. The characterization, regulation, and function of insulin receptors on osteoblast-like clonal osteosarcoma cell line. *J Bone Miner Res* 1989;4(6):853–62.

Raghoobar GM, Batenburg RH, Vissink A, Reintsema H.. Augmentation of localized defects of the anterior maxillary ridge with autogenous bone before insertion of implants. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996;54(10):1180-6.

Räkel A, Sheehy O, Rahme E, LeLorier J. Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2008;34(3):193–205.

Rix M, Andreassen H, Eskildsen P. Impact of peripheral neuropathy on bone density in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 1999 May;22(5):827-31

Rosenbloom AL, Lezotte DC, Weber FT. Skeletal and joint manifestations of childhood diabetes. *Pediatr Clin North Am* 1984;31(3):569-89

Schwartz, A.V. Diabetes mellitus: does it affect bone? *Calcif. Tissue Int* 2003;73(6), 515–9

Selby PL. Osteopenia and diabetes. *Diabetic Med* 1988;5(5):5423-28.

Shyng YC, Devlin H, Sloan P. The effect of streptozotocin-induced experimental diabetes mellitus on calvarial defect healing and bone turnover in the rat. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001;30(1):70–4

Taguchi Y, Amizuka N, Nakadate M, Ohnishi H, Fujii N, Oda K, et al.. A histological evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane. *Biomaterials*. 2005;26(31):6158-66.

Takizawa M, Suzuki K, Matsubayashi T, Kikuyama M, Suzuki H, Takahashi K et al. Increased bone resorption may play a crucial role in the occurrence of osteopenia in patients with type 2 diabetes: possible involvement of accelerated polyol pathway in its pathogenesis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008 Oct;82(1):119-26.

Tera TM. Imunolocalização dos marcadores de formação e reabsorção óssea em regeneração óssea guiada em ratas com deficiência estrogênica [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista - UNESP; 2010.

Thraikill KM, Liu L, Wahl EC, Bunn RC, Perrien DS, Cockrell GE, et al. Bone formation is impaired in a model of type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54(10):2875–81.

Tuominen JT, Impivaara O, Puukka P, Rönnemaa T. Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999;22(7):1196–200.

Valerio G, del Puente A, Esposito-del Puente AE, Buono P, Mozzillo E, Franzese A. The lumbar bone mineral density is affected by long-term poor metabolic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Horm Res* 2002; 58(6):266–72

Verhaeghe J, Suiker AM, Nyomba BL, Visser WJ, Einhorn TA, Dequeker J, Bouillon R. Bone mineral homeostasis in spontaneously diabetic BB rats. II. Impaired bone turnover and decreased osteocalcin synthesis. *Endocrinology*. 1989;124(2):573-82.

Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes—a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2007;18(4):427–44.

Vestergaard P. Bone metabolism in type 2 diabetes and role of thiazolidinediones. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2009;16(2), 125–31.

Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Diabetes and its complications and their relationship with risk of fractures in type 1 and 2 diabetes. *Calcif. Tissue Int* 2009;84(1), 45–55.

von Arx T, Buser D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Aug;17(4):359-66.

Weiss RE, Reddi AH. Influence of experimental diabetes and insulin on matrix-induced cartilage and bone differentiation. *Am J Physiol* 1980;238:E200-7.

Williamson, R.A. Rehabilitation of the resorbed maxilla and mandible using autogenous bone grafts and osseointegrated implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996;11(4):476-88.

Wiske PS, Wentworth SM, Norton JA, Epstein S, Johnston CC. Evaluation of bone mass and growth in young diabetics. *Metabolism* 1982; 31:2348-854.

ANEXO 1

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Domingos
CEP: 12201-970 - F: (12) 3943-9028
E-mail: (12) 3943-9010 / yasmim@fopq.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **2/2011-PA/CEP**, sobre **"A influência da Diabetes Mellitus no reparo de enxertos ósseos autógenos associados ou não à membrana colágena reabsorvível: Estudo histomorfométrico em ratos"**, sob a responsabilidade de **AUGUSTO CESAR DE ANDRADE MEYER**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA e Lei Arouca nº 11.794 de 08/10/2008 e foi aprovado por este Comitê de em Pesquisa.

São José dos Campos, 13 de janeiro de 2011.

Prof. Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora